

Gleichzeitig wurde bemerkt, dass anti-Cad-ICD-positive Kontakte nicht zu allen Nestern hergestellt wurden (Abb. R26f, S. 56), wobei Nester im Gewebe durch ihre charakteristische Zellkern-Anordnung leicht von anderen Zellen zu unterscheiden waren (Abb. R26f,g). Des weiteren wurden in einigen Nestern ringförmige (Abb. R28c,d, S. 58) und Korkenzieher- (Abb. R28b, S. 58) Strukturen beobachtet. Die Strukturen dieser Signale erinnerten an die spiral- und ringförmigen anti-LiAS-Signale am basalen Pol reifer Stenotelen (vgl. Abb R17a, S. 43, Abb R19b, c; S. 45), waren jedoch im Falle der anti-Cadherin-Signale im Durchmesser deutlich kleiner. Da aus technischen Gründen nicht die Möglichkeit bestand die gezeigten confokalen Aufnahmen mit DIC-Kontrast zu kombinieren, konnte die Position dieser Strukturen nur im Vergleich zur DAPI-Kernfärbung bestimmt werden. Daher konnte der Differenzierungszustand der betreffenden Nester nicht näher bestimmt werden. Zusätzlich zu Nervenzell-Nest-Kontakten konnten im Rumpf einige schwach anti-Cad-ICD-positiv Zellkerne beobachtet werden (Abb. R27 b,c; S. 57).

Auch betreffend des Tentakel-Nervennetzes konnten die Ergebnisse der anti-HyCad-ICD-Färbung durch eine Präinkubation von lebenden Tieren in 1% DMSO in Hydra-Medium und anschließender kurzer Methanol-Fixierung bzw. FHO-Fixierung (Formaldehyd 1:10 in Hydra-Medium) optimiert werden. Durch diese Optimierung konnten ausgehend von anti-HyCad-ICD positiven Nervenzellen, lappenartige Strukturen und köpfchenförmige Enden detektiert werden (Abb. R26e, S. 56; R27a, S. 57). Diese Strukturen befanden sich ähnlich wie die weiter oben beschriebenen anti-HyCad-EXD „Flecken“ in unmittelbarer Nachbarschaft zu integrierten Nematocyten (Abb. R28 a, S.58). Zusätzlich konnten auch schwache Nematocytenumrisse in den Tentakel (Abb. R 27a, S. 57; R28a, S. 58) beobachtet werden, die allerdings in Mehrkanalaufnahmen untergingen und zur besseren Verdeutlichung als Einzelkanalbild gezeigt sind.

Da anti-HyCadherin-Signale (anti-HyCad-ICD und anti-HyCad-EXD) in räumliche Nähe bzw. direktem Kontakt zu Nematocyten beobachtet wurden und eine Interaktion zwischen rekombinantem Cadherin und LiAS vorlag, sollten in anti-Cadherin/anti-LiAS-Co-Färbungen mögliche Interaktionsbereiche im Tier analysiert werden.

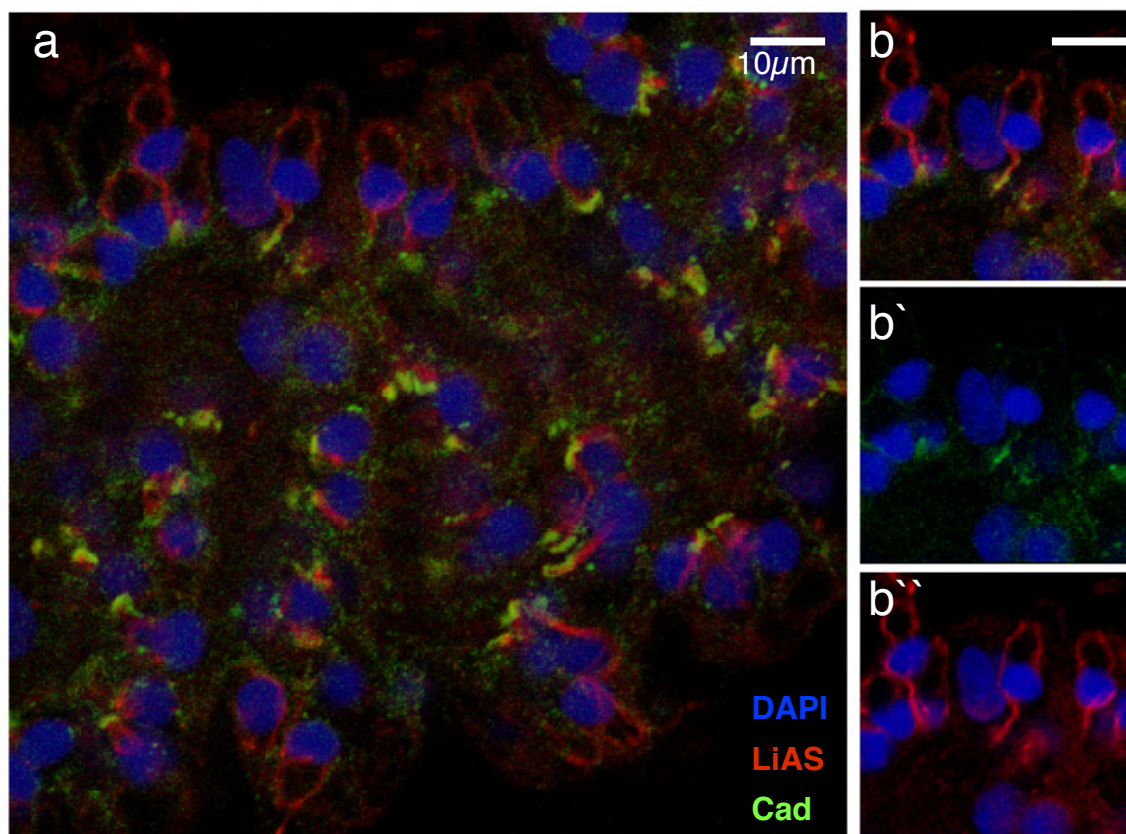


Abb. R29: Co-Lokalisation von LiAS und Cadherin an der Basis von Nematocyten in Batteriezellen im Tentakel

(a) Die CLSM-Auswertung von anti-HyCad-EXD (grün) und anti-LiAS (rot) Doppelfärbungen zeigte Co-Lokalisation (gelb) beider Signale in Demonemen und Stenotelen, nahe der Mesogloea. Dabei fiel besonders bei Desmonemen (b'') auf, dass sich der gemeinsam gefärbte Bereich allein auf das basale Ende der Zellausläufer (b) beschränkte. Details siehe Text. Maßstab: je 10 µm.

4.3.2. Kolokalisation von anti-HyCad-EXD/anti-LiAS

Für den Erfolg der Färbung war es neben einem Refixierungsschritt nach der ersten Färbung notwendig, dass die anti-HyCad-EXD-Färbung vor der anti-LiAS-Reaktion durchgeführt wurde und ein über-Nacht Blockierungsschritt in einer Mischung aus BSA, Tween und Ngs durchgeführt wurde. Als Resultat dieser Co-Färbung konnte eine Kolokalisation beider Signale beobachtet werden (Abb. R29). Dabei lagen Anti-LiAS und anti-HyCad-EXD-Signale an der Basis von Stenotelen bzw. am basalem Ende von Desmonemenfortsätzen vor (Abb. R29b).

Leider war es nicht möglich die Bedingungen für eine anti-HyCad-ICD/anti-LiAS-Co-Färbung hinreichend zu optimieren. Um trotzdem beide Färbungen indirekt vergleichen zu können wurde anti-HyCad-ICD und anti- β -Tubulin kombiniert und die Ergebnisse anhand der Orientierung von anti- β -Tubulin-Signalen mit den entsprechenden anti-LiAS/anti- β Tubulin Doppelfärbungen verglichen.

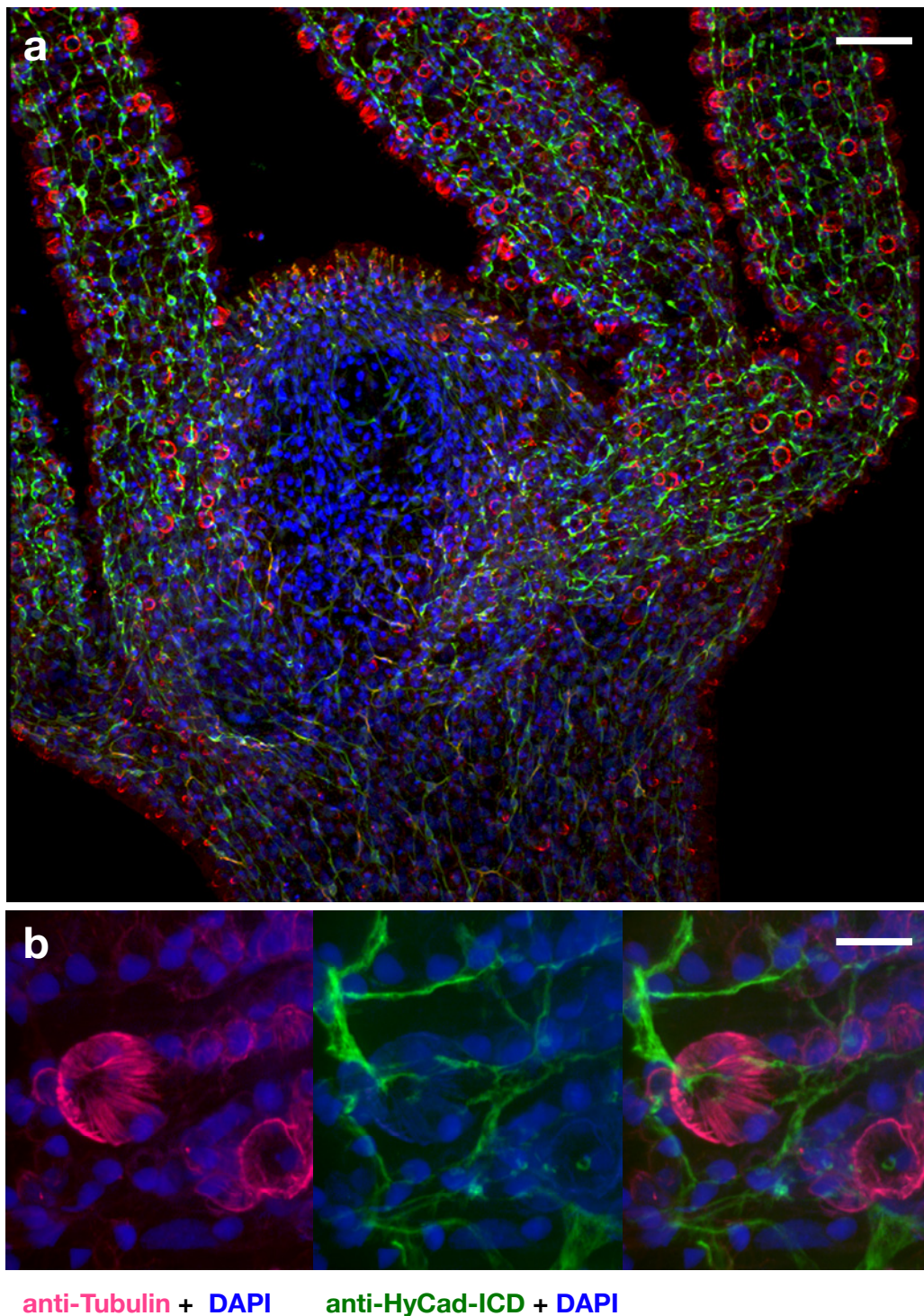


Abb. R30: anti- β -Tubulin/anti-HyCad-ICD-Co-Färbung (Spinning-Disk)

Details siehe Text; Maßstab: (a) 50 μm , (b) 10 μm

4.3.3. Räumliche Orientierung von anti-Cadherin im Bezug zu anti- β -Tubulin

Wie bereits weiter oben beschrieben traten anti- β -Tubulin und anti-LiAS Signale an entgegengesetzten Zellpolen auf. Durch diese charakteristische Anordnung beider Signale zueinander, konnte von anti-Cad-ICD/anti- β -Tubulin Färbung auf die zu erwartenden Position der anti-LiAS-Signale geschlossen werden.

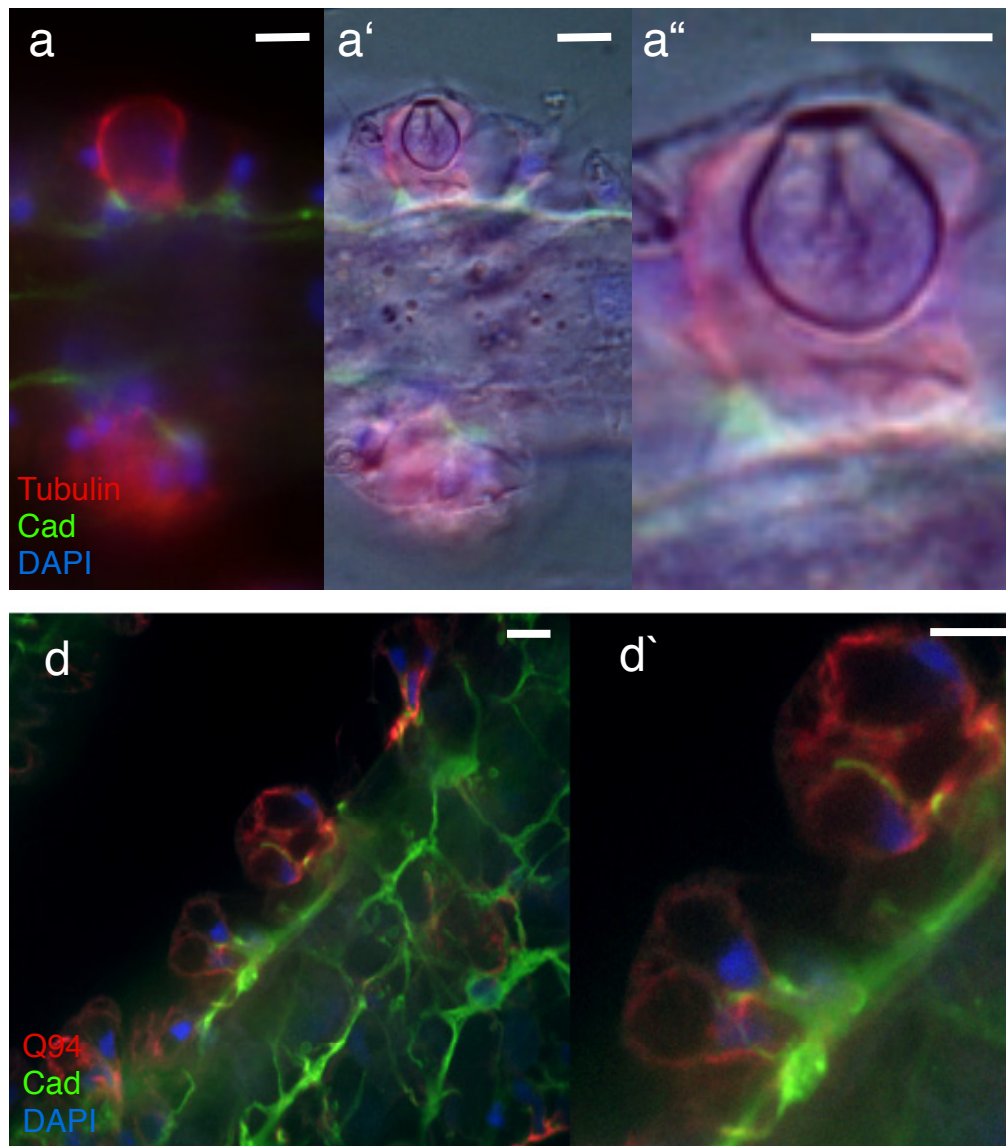


Abb. R31: anti-Cadherin Co-Färbungen mit anti- β -Tubulin und Q94 Antikörper

Abbildung (a-c) zeigen Co-Färbungen mit anti- β Tubulin (rot) als CLSM (a-b) und Fluoreszenz Aufnahme (c-c''), während die Abbildungen (d) und (d') Co-Färbungen mit Q94 (rot) Antikörper in Kombination mit DAPI- Kernfärbung (blau). In beiden Färbungen erkennt man in Batteriezellen eine enge Nachbarschaft zwischen Nerven und Nematocyten. (Details siehe Text.)

In den durchgeführten Doppelfärbungen konnte deutlich ein apikaler anti- β -Tubulin-positiver Korb oberhalb des Kapselvesikels beobachtet werden (Abb R 30, S. 61). Gleichzeitig zeigte sich, dass die weiter oben beschriebenen anti-Cadherin-positiven Lappchen-Ausläufer von Nervenzellen (Abb. R 26e, S. 59; R28a, S. 58) im Tentakel tatsächlich unmittelbar unterhalb von integrierten Nematocyten auftraten und Nervenzellen Kontakt zu eingebauten Nematocyten aufnahmen (Abb. R31).

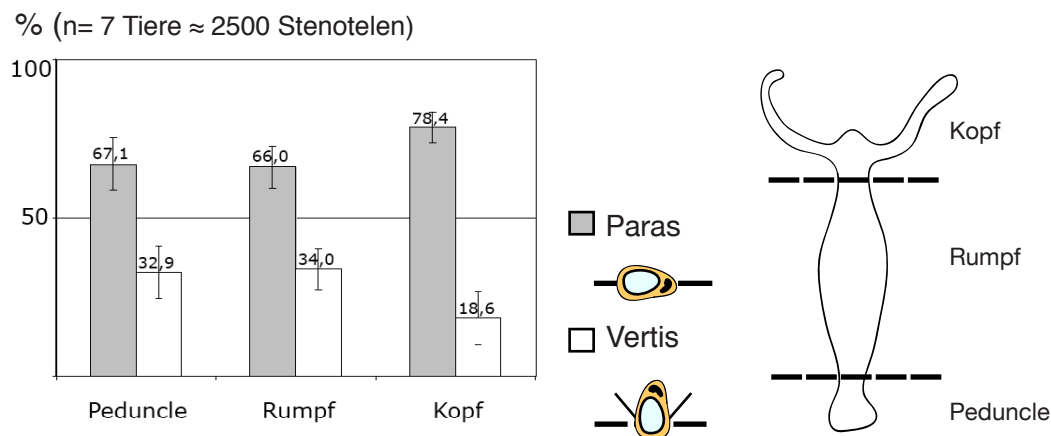


Abb. R32: Statistische Auswertung der Orientierung des Stilettapparates von Stenotelen gegenüber anti-Cad-positiven Nervenzellen

Die Auszählung von migrierenden Stenotelen (n=7 Tiere) ergab im Fußbereich (Peduncle) einen erhöhten Anteil von parallel zum Nerv orientierten Nematocyten (Paras) im Vergleich zu Nematocyten mit einer Abweichung von mehr als 50°-60° (Vertis). Ähnliche Ergebnisse ergaben Auswertungen im Rumpf und Kopf des Tieres mit einer besonders hohen Differenz zwischen Paras und Vertis im Kopfbereich. Da bei zufälliger Orientierung gleiche Verhältnisse zu erwarten wären, sprechen die Ergebnisse für eine richtungsweisende Rolle Cadherin-positiver Nerven in der Migration von Nematocyten.

Zusätzlich konnte im Rumpfbereich der Tiere eine gehäufte Ausrichtung wandernder Stenotelen parallel zu anti-HyCad-ICD-positiven Nerven beobachtet werden. Diese Korrelation zwischen meist paralleler Ausrichtung zu anti-HyCad-ICD-positiven Axonen und migrierenden Zellen legte die Vermutung nahe, dass anti-HyCad-ICD-positive Nerven an der Wegfindung von wandernden Nematocyten beteiligt sein könnten. Sollte es sich um eine reine Zufallskorrelation handeln, würde man bei der Analyse von parallel und nicht parallel angeordneten Stenotelen ein Verhältnis von 50:50 erwarten. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden in 7 Tieren die prozentualen Anteile von parallel (*Para*) und vertikal (*Verti*) orientierten Stenotelen ermittelt (Abb. R32).

Für die Auswertung wurde ein Winkel von über 50-60° zwischen anti-Cad-ICD-positiven Nerv und Stilettapparat, als Ausschlusskriterium für *Paras* festgesetzt und Stenotelen mit höhere Abweichungen als *Vertis* gewertet. Eingebaute Stenotelen konnten leicht durch ihren nach oben ausgerichteten Stilettapparat von wandernden Stenotelen unterschieden werden und flossen so nicht in die Auswertung mit ein.

In den drei untersuchten Körperregionen wich das Verhältnis zwischen *Paras* und *Vertis* deutlich von einer 50:50 Verteilung ab und wies stark auf eine bevorzugte Orientierung hin. So konnten im Fuß 67,1 % ($\pm 8,3$ %) *Paras* im Vergleich zu 32,9 % ($\pm 8,3$ %) *Vertis* beobachtet werden. Im Bereich der Köpersäule wurde ein ähnliches Verhältnis von 66 % ($\pm 6,5$ %) *Paras* zu 34 % ($\pm 6,5$ %) *Vertis* ermittelt. Hingegen zeigten sich im Kopfbereich die größten Abweichungen von 78,4 % ($\pm 4,8$ %) *Paras* zu 18,6 % ($\pm 8,5$ %) *Vertis*.

Diskussion

1. bHLH-Faktoren in *Hydra*

In der Regel wird *Hydra* als einfacher Organismus mit wenigen Zelltypen, und nur zwei Epithelien beschrieben. Doch diese äußerliche Schlichtheit täuscht über eine unerwartete Komplexität auf molekularer Ebene hinweg. Wie von Steel anschaulich zusammengefasst (Steele, 2002), verfügt *Hydra* bereits über alle wichtigen und entwicklungsbiologisch relevante Signalwege, wie z.B. den Wnt- oder Notch/Delta-Signalweg (Guder *et al.*, 2006; Käsbauer *et al.*, 2007; Khalturin *et al.*, 2007; Steele, 2002). Außerdem konnten typisch mesodermale bzw. Blastoporus-assoziierte Gene wie Brachyury/T-box-Homologe (Bielen *et al.*, 2007; Technau & Bode, 1999; Technau & Scholz, 2003) identifiziert werden, deren genaue Funktion in *Hydra* Gegenstand aktueller Forschung ist.

Diesem unerwarteten Reichtum an Signalwegen und homologen Komponenten stand überraschenderweise nur ein Vertreter der bHLH-Superfamilie gegenüber: das AS-C-Homolog Cnash (Grens *et al.*, 1995). Zwar sprach vieles für die Anwesenheit weiterer bHLH-Proteine wie z.B. Vertretern der ubiquitär exprimierten Klasse I bHLH (E-Proteine, Daughterless-Homologe), doch lagen keine publizierten Daten über entsprechende Homologe in *Hydra* vor und entsprechende Sequenzendaten wurden erst im Zuge des EST- und Genom-Projekts zugänglich. Aus diesem Grund galt lange Zeit das erst beschriebene AS-C-Homolog Cnash, als das einzige neurale bHLH-Gen in *Hydra* (Grens *et al.*, 1995; Hayakawa *et al.*, 2004). Basierend auf dieser Annahme schlussfolgerte man bislang: (i) das Vorhandensein nur eines AS-C-Homologs in *Hydra* erkläre sich aus dem primitiven Zustand des Nervensystems bzw. das Nervensystem repräsentiere einen ursprünglichen Zustand, weil unter anderem nur ein AS-C-Homolog vertreten sei. (ii) Daraus folgt, dass die AS-C-Familie die ältere der beiden neuronalen Klasse II bHLH-Familien repräsentiert (Skaer *et al.*, 2002) und die verschiedenen ARP-Subfamilien später entstanden. (iii) Als Erklärung des heutigen Zustandes müssen im Verlaufe der Evolution ein oder mehrere Duplikationsereignisse nach Trennung der Diploblasten und Triploblasten stattgefunden haben (Skaer *et al.*, 2002), die im Falle der AS-C-Familie zu den heute bekannten Komplexen führten (am Beispiel von *Drosophila*: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*) und *asense* (*ase*)).

Forschungsergebnisse der letzten Jahre und die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass einige dieser Hypothesen neu überdacht bzw. revidiert werden müssen. So gelang es beispielsweise in *Podocoryne carnea* mehrere bHLH-Proteine nachzuweisen, unter denen nicht nur AS-C- sondern auch ARP- und Id-Homologe vertreten waren (Müller *et al.*, 2003; Seipel & Schmid, 2005; Seipel *et al.*, 2004a; Seipel *et al.*, 2004b). Ebenso gelang es in der vorliegenden Arbeit mit *hyLiAS/LiAS* und *hyAS-C3* zwei weitere *Hydra*-AS-C-Homologe zu klonieren, von denen LiAS genauer charakterisiert werden konnte (siehe dazu weiter unten). Folglich sind bereits in

Cnidariern mindestens drei AS-C-Homologe vertreten. Des Weiteren konnten mit *hyAth-a*, *hyNgn*, *hyNeuroD* und *hyNATO/p48* vier ARP-Homologe kloniert werden, die höchstwahrscheinlich drei Subfamilien der ARP-Gruppe (Bertrand *et al.*, 2002; Hassan & Bellen, 2000) von Klasse II bHLH-Faktoren vertreten. Diese Ergebnisse relativieren die Annahme, bei der AS-C-Gruppe handle es sich um die ältere der beiden neuronalen Klasse II bHLH-Familien und deuten darauf hin, dass bereits in den Anfängen der Nervensystementwicklung vor etwa 600 Millionen Jahren zwei neurale Klasse II bHLH-Familien vorhanden waren.

Zusätzlich zu neuronalen bHLH-Faktoren konnte in *Hydra*-Datenbanken ein Scleraxis-Homolog (*hyScl*) aus der Familie der Twist-Homologe identifiziert werden (Brown *et al.*, 1999; Burgess *et al.*, 1995; Cserjesi *et al.*, 1995; Muir *et al.*, 2005; Noda *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2003; Shukunami *et al.*, 2006; Wilson-Rawls *et al.*, 2004). Während Vertebraten-Homologe von Scleraxis mit der Entwicklung von Sehen und Knorpel assoziiert werden (Brown *et al.*, 1999; Mendias *et al.*, 2008; Murchison *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2003; Satoh *et al.*, 2006; Shukunami *et al.*, 2006; Yeghiazaryan *et al.*, 1999), steht die übergeordnete Twist-Familie in der Regel im Zusammenhang mit Gastrulationsbewegungen und der Differenzierung des Mesoderms (Brown *et al.*, 1999; Burgess *et al.*, 1995; Cserjesi *et al.*, 1995; Leptin, 1991; Leptin & Grunewald, 1990; Muir *et al.*, 2005; Noda *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2003; Shukunami *et al.*, 2006; Technau & Scholz, 2003; Wilson-Rawls *et al.*, 2004). Diese Resultate zusammen mit einer kürzlich veröffentlichten vergleichenden phylogenetischen Analyse der bHLH-Familien von Simionato (Simionato *et al.*, 2007) korrigieren den bisherigen Mangel an Vertretern der bHLH-Superfamilie in *Hydra* und legen nahe, dass *Hydra* über etwa 33 bHLH-Proteine verfügt, die 17 bis 20 verschiedene bHLH-Familien repräsentieren (Simionato *et al.*, 2007). Allerdings handelt es sich bei den von Simionato und Kollegen publizierten Daten um Schätzungen, die hauptsächlich auf der Analyse von assemblierten Genomdaten beruhen und daher einen gewissen Spielraum nach oben und unten enthalten.

Bezüglich neuronal relevanter bHLH-Klassen (I, II, V, VI) konnten neben den hier beschriebenen und in der Regel aktivierend wirkenden *Hydra* Klasse II-bHLH-Proteine der AS-C- und ARP-Familie (Klasse A/B nach Simionato) auch inhibitorische Klassen (Klasse V: Id-Proteine und Klasse VI: Hairy/Enhancer of Split/HES-Proteinen) im Zuge der *Hydra*-Datenbankanalyse identifiziert werden (Simionato *et al.*, 2007). Die Summe dieser Daten legt weiterhin nahe, dass bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Nervensystem-Evolution ein bHLH-Netzwerk an der Selektion und Differenzierung von neuronalen Zellen beteiligt gewesen sein muss. Diese Hypothese wird durch eine vergleichbare Vielfalt von ASC- und ARP-Homologen in *Nematostella vectensis* (Anthozoa) unterstützt, die gegenwärtig näher untersucht werden (Watanabe, Bertulat, Fujisawa, Holstein, in Vorbereitung).

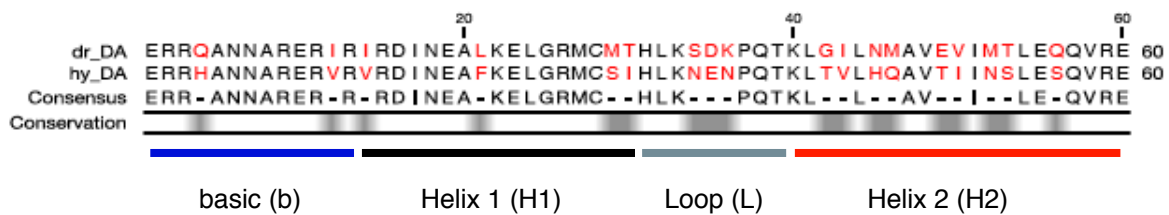


Abb. D1: Vergleich des *Hydra*-Daughterless-Homologes mit dem verwendeten THS-Köderkonstrukt

Beim Sequenzvergleich zwischen verwendetem THS-Köderkonstrukt dr_DA und dem entsprechendem hy_DA Homolog aus *Hydra* Datenbanken zeigten sich besonders in Helix 2 (H2) Abweichungen (rot). Für beide Sequenzen sind die konservierten Abschnitte hell unterlegt, während die farbigen Balken unterhalb des Alignments die jeweiligen Motivabschnitte umreißen.

Die beschriebenen Ergebnisse fordern weiterhin eine Modifizierung des von Skaer und Kollegen (Skaer *et al.*, 2002) angenommenen Duplikations-Szenarios der AS-C-Familie, das, basierend auf der Annahme es gäbe nur ein AS-C-Homolog in *Hydra*, nach der Abspaltung der Cnidariier erfolgt sein soll. Die Klonierung von mindestens drei verschiedenen *Hydra*-AS-C-Homologen deutete darauf hin, dass die von Skaer und Kollegen postulierte Duplikation der AS-C-Gruppe bereits im letzten gemeinsamen Vorfahren von Cnidariern und Triploblasten statt fand. Alternativ ist nicht auszuschließen, dass in Cnidariern und Triploblasten unabhängige Duplikationsereignisse erfolgten.

Die oben beschriebenen Erfolge im Allgemeinen bzw. die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Besonderen beruhen maßgeblich auf dem Zugang zu EST- und Genomdatenbanken, während sich herkömmliche Methoden zur Isolierung von bHLH-Proteinen (PCR-Varianten oder Screeningverfahren) als weniger erfolgreich erwiesen. Beispielsweise verlief ein Oligo-Genbank-Screen unter niedrig stringenten Bedingungen erfolglos und obwohl das im Hefe-THS eingesetzte Daughterless (DA)-Köderkonstrukt in *Podocoryne carnea* zu Identifizierung mehrerer bHLH-Homologe unterschiedlicher Familien beitrug, konnte in *Hydra* nur ein AS-C-Homolog (LiAS/hyLiAS) isoliert werden.

Eine Erklärung für die überraschend geringe Ausbeute des THS könnte zum einen in der relativ geringen Anzahl durchgemusterter Klone und zum andern in deutlichen Sequenzunterschieden zwischen *Hydra* und *Drosophila* Daughterless begründet liegen. So wurden beispielsweise bei einem Sequenzvergleich zwischen Daughterless-Homologen aus *Drosophila* und *Hydra* (identifiziert in *Hydra*-Datenbanken) innerhalb der 60 AS des bHLH-Motivs 18 abweichende Positionen beobachtet (Abb. D1), von denen allein 9 im ca. 21 AS lange Helix 2-Abschnitt lokalisiert waren (Abweichung von 43% bezogen auf Helix 2). Da speziell dieser Proteinabschnitt die Interaktion mit anderen bHLH-Proteinen vermittelt, könnten die artspezifischen Unterschiede die Interaktion mit Klasse II *Hydra*-bHLH-Proteinen erschwert haben was letztendlich mit dazu beitrug, den Hefe-THS zu Gunsten von Datenbankanalysen einzustellen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass *Hydra* allenfalls äußerlich als einfacher Organismus bezeichnet werden sollte und auf molekularer Ebene über Vielzahl an Möglichkeiten und Regulationsmechanismen verfügt, die artübergreifend in Arthropoden und Vertebraten konserviert sind.

1.1. *Hydra* bHLH-Faktoren und Differenzierung von I-Zellen

Die Familie der bHLH-Faktoren ist in sehr konservierte Weise an der Selektion von Vorläuferpopulationen und deren Spezifizierung zu unterschiedlichen Zelltypen beteiligt und wirkt unter anderem an der Hämatopoese, Bildung des Pankreas, der Myogenese und Neurogenese mit (Bertrand *et al.*, 2002; Campuzano & Modolell, 1992; Chae *et al.*, 2004; Cronmiller & Cline, 1987; Guillemot, 1995; Guillemot, 1999; Hassan & Bellen, 2000; Jan, 1993; Jarman, 2000; Lee, 1997a; Lee, 1997b; Massari & Murre, 2000; Quan *et al.*, 2004; Quan & Hassan, 2005; Ross *et al.*, 2003; Vervoort & Ledent, 2001; Vetter & Brown, 2001; Weintraub, 1993; Zhang *et al.*, 1999). Dabei werden multipotente Vorläuferpopulationen durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener bHLH-Klassen und -Familien reguliert und schrittweise in verschiedene Zelllinien und Zelltypen differenziert.

Übertragen auf *Hydra* repräsentieren interstitielle Stammzellen multipotente Vorläufer, die auf unterschiedlichen Differenzierungswegen zu Etablierung des gesamten Nervensystems, der Drüsenzelllinien und Gameten beitragen (Bode, 1996; Koizumi *et al.*, 1990). Wie bereits weiter oben angedeutet lag es nach der Identifizierung des AS-C- Homolgs Cnash (Grens *et al.*, 1995) und seiner Assoziation mit neuronalen Differenzierungsprodukten (Hayakawa *et al.*, 2004) nahe, weitere bHLH-Proteine zu vermuten, die an der Spezifizierung des I-Zell-Systems beteiligt sein könnten. Diese Arbeitshypothese konnte durch die vorliegenden Ergebnisse teilweise bestätigt werden. Allerdings ergaben sich bei der Charakterisierung einiger bHLH unerwartete Schwierigkeiten, die eine eindeutige Zuordnung der entsprechenden bHLH-Proteine zum I-Zell-System bzw. zu einer definierten Funktion innerhalb der I-Zelldifferenzierungswege verhinderten.

1.1.1. Die *Hydra* ARP-Homologe

Von den beiden neuronalen bHLH-Familien stellt die ARP-Familie eine Übergruppe dar, die in weitere Subfamilien unterteilt werden kann (Bermingham *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2004; Gradwohl *et al.*, 2000; Hassan & Bellen, 2000; Jarman *et al.*, 1993a; Jarman *et al.*, 1993b; Lee, 1997b; Ma *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 1996). Die wichtigsten Familien der ARP-Gruppe werden dabei von Atonal-Homologen (Ath), Neurogenin (Ngn) und NeuroD (ND) repräsentiert. Diese Familien sind in Vertebraten und *Drosophila* an der Differenzierung verschiedener neuronaler Zelllinien und Organe beteiligt (Massari & Murre, 2000). Beispielsweise wurden Atonal-Homologe mit der Entwicklung von Mechanorezeptoren (Chondrotonales Organ in *Drosophila*, Innenohr-Haarzellen bei Vertebraten), Riechepithel und

Photorezeptoren (Vertebraten und *Drosophila*) beschrieben (Hassan & Bellen, 2000; Jarman, 2002; Jarman *et al.*, 1993a; Jarman *et al.*, 1993b; Jarman *et al.*, 1994; Kanekar *et al.*, 1997; Vetter & Brown, 2001), während Neurogenin und NeuroD in Vertebraten neben der Differenzierung neuronaler Zellen auch an der Entwicklung Insulin-produzierender Zellen im Pankreas beteiligt sind (Bertrand *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2004; Harb *et al.*, 2006; Hoshino, 2006; Kageyama *et al.*, 2000; Schwitzgebel, 2001; Sommer *et al.*, 1996).

Auch in *Hydra* scheinen die oben genannten ARP-Subfamilien vertreten, was sich durch höhere Sequenzabweichung innerhalb *Hydra*-ARP-Familie im Vergleich zur *Hydra*-AS-C-Gruppe andeutete und durch blastX Analyse bestätigt werden konnte. Auf Grund der höheren Ähnlichkeit der Cnidarier ARP-Homologe bzw. der Triploblasten ARP-Homologe untereinander, scheiterte jedoch eine entsprechende Zuordnung der *Hydra*-ARP-Homologe zu verschiedenen Vertebraten-Homologen der ARP-Subfamilien durch phylogenetische Stammbaumrekonstruktion. Dies führt dazu, dass sich Cnidarier-Sequenzen ausschließlich mit anderen Cnidariern Sequenzen gruppieren und die ARP-Familie phylogenetisch nicht gut aufgelöst werden konnte. Ähnlich Schwierigkeiten sind auch von anderen *Hydra* Phylogenien bekannt (*Hydra* wnt Phylogenie; Lengfeld, Simarkov, Bode, Holstein in Vorbereitung) und lassen sich wahrscheinlich nur durch eine Modifizierung der entsprechenden Algorithmen lösen (Simarkov, Holstein; Tagungsbeitrag 2007)

Im Rahmen der Sequenzanalyse von *Hydra* bHLH-Faktoren wurden die Protein- und Nucleotidsequenzen mit verschiedenen freizugänglichen Analyse-Programmen (ExPassy), darunter auch dem Programm „PSORT“, untersucht. Als Resultat dieser Analyse wurden bei *Hydra* Ath-a, *Hydra* Neurogenin und *Hydra* NeuroD typische Kernlokalisationssequenzen wie z.B. pat4-(KxxK) oder bipartite-(KRxxxxxxxxKTKK)-Motive identifiziert, die *Hydra* NATO/p48 überraschenderweise fehlten. Da jedoch ein Abschnitt mit basischen Aminosäuren, wie ihn die basische Domäne des bHLH-Motivs vertritt, als Kernlokalisationssignal fungieren kann, bestand auch für *Hydra* NATO/p48 eine hohe Kernlokalisationswahrscheinlichkeit, die eine Funktion aller *Hydra*-ARP-Homologe als Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich macht.

Leider erwies sich die Expressions-Analyse der vier *Hydra* ARP-Homologe als problematisch: trotz erheblichen Aufwands konnten keine konsistente ISH-Resultate erzielt werden. Einzig für *hyNgn* konnten erste RNA-ISH-Daten generiert werden, die jedoch weiterer Bestätigung bedürfen und aus diesem Grund nicht in den Ergebnisteil aufgenommen wurden (siehe Anhang). Unter den genannten Einschränkungen schien auch *hyNgn* in I-Zellderivaten vertreten zu sein. Dabei entstand der Eindruck, dass eine wesentlich größere I-Zellpopulation im Rumpfbereich gefärbt war (siehe Anhang) als in vergleichbaren ISH mit *Cnash* oder *LiAS*. Dies könnte auf einen anderen Differenzierungsweg oder anderen Differenzierungsabschnitt dieser Population hinweisen.

Da die Neurogenin-Familie unterschiedliche Funktionen in der Neurogenese übernimmt und ebenfalls an der Spezifizierung sekretorischer Zellen (speziell im Pankreas) beteiligt ist (Chae *et al.*, 2004), ist es schwierig eine mögliche Funktion innerhalb des I-Zell-Systems abzuleiten. *Hydra*-Neurogenin könnte sowohl in einem der beiden neuronalen Differenzierungswege als auch in der Drüsenzelllinie exprimiert werden (unter der Annahme, dass eine Ähnlichkeit zwischen Pankreaszellen und *Hydra*-Drüsenzellen besteht). Aus anderen Organismen ist bekannt, dass die Neurogenin-Expression in einigen zellulären Kontexten der NeuroD-Expression vorausgeht bzw. die NeuroD Expression von Neurogenin abhängig ist (Chae *et al.*, 2004). Aus diesem Grund könnte *hyNgn* Kandidat für ein frühes Selektorgen sein, das in einer proliferierenden I-Zell-Population exprimiert wird. Ähnlich schwierig gestalten sich auch Vermutungen über die Funktionen von *Hydra* NeuroD (*hyNeuroD*) und *Hydra* NATO/p48, deren Homologe in Vertebraten ähnlich wie Neurogenin ebenfalls Funktionen außerhalb der Neurogenese erfüllen. Da *Hydra* NATO/p48 neben Homologie zur NATO-Familie vergleichbar hohe Ähnlichkeit zum pankreasspezifischen Transkriptionsfaktor p48 zeigt könnte das *Hydra*-Homolog möglicherweise eine Drüsenzell-assoziierte Funktion erfüllen. Allerdings bleiben diese Möglichkeiten vorerst spekulativ und bedürfen weiterer Bestätigung.

Im Gegensatz zur Neurogenin- und NeuroD-Subfamilie scheinen Atonal-Homologe keine Funktionen außerhalb der Neurogenese zu übernehmen. Da in den bisher untersuchten Organismen Atonal- und AS-C-Homologe gemeinsam an der Etablierung des Nervensystems beteiligt sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch in *Hydra* Atonal und AS-C-Homologe für die Spezifizierung der beiden neuronalen Differenzierungswege (dem Nerven- (NvDP) und dem Nematocytendifferenzierungsweg (NemDP)) verantwortlich sein könnten. Vor dem Hintergrund, dass Atonal-Homologe in anderen Organismen an der Spezifizierung von Mechanorezeptoren, Photorezeptoren, Riechzellen und weitere neuronale Zelllinien mitwirken, könnte *hyAth-a* an der Differenzierung von sensorischen Nervenzellen beteiligt sein. Sollte diese Vermutung zutreffen, könnte die Expression in Nervenzellen ursächlich für die problematische ISH-Expressionsanalyse sein, da RNA-ISH-Experimente aus unbekannten Gründen für Nervenzellen kritisch sind. Als ein Beispiel hierfür können *Hydra* Cadherin-ISH Ergebnissen angeführt werden, bei denen es bisher nicht gelang Nervenzellfärbung nachzuweisen obwohl mit entsprechenden Cadherin-Antikörpern eindeutig anti-Cadherin-positive Nervenzellen identifiziert werden konnten (Kostron, Hobmayer, Bertulat, Özbek, Holstein, in Vorbereitung). Zusammenfassend gibt es erste Hinweise auf eine Verknüpfung von I-Zellen und *Hydra*-ARP-Homologen, doch bleibt die Funktion aller *Hydra*-ARP bis zur genauen Klärung von Expressionsmuster und Zellzykluszustand spekulativ.

1.1.2. Die Hydra AS-C-Homologe

Die Familie der AS-C-Homologe stellt neben der ARP-Großfamilie eine von zwei neuronalen Klasse II bHLH-Gruppen dar, die ursprünglich im Zusammenhang mit externen Sinnesrezeptoren im peripheren Nervensystem (PNS) von *Drosophila* beschrieben wurde (Campos-Ortega, 1998; Campuzano *et al.*, 1985; Campuzano & Modolell, 1992; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 1989; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 1990; Ghysen & Dambly-Chaudiere, 1993; Ghysen & Richelle, 1979). Vertebraten Homologe des Achaete/Scute-Komplexes (Mash, Cash, Xash, usw.) werden wichtige Rollen in der Etablierung einer Reihe von neurosekretorischen Zellen und Oligodendrocyten zugeschrieben (Cau *et al.*, 2002; Cau *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1993; Hatakeyama *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 1999; Kageyama *et al.*, 2005; Kameda *et al.*, 2007; Kokubu *et al.*, 2008; Kondo & Raff, 2000; Parras *et al.*, 2007; Pattyn *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2000). Darüber hinaus scheinen AS-C-Homologe ebenfalls das Migrationsverhalten von neuronalen Vorläuferzellen und Neuralleistenzellen zu beeinflussen (Ge *et al.*, 2006; Kageyama *et al.*, 2005; Lo *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1997; Tamai & Nishiwaki, 2007) und zusammen mit ARP-Familienmitgliedern die zeitlich und kontextabhängige Entwicklung von neuronalen Vorläuferpopulationen zu steuern (Cau *et al.*, 2002; Helms *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2006; Ohsawa *et al.*, 2005; Parras *et al.*, 2002; Tomita *et al.*, 1996; Vetter & Brown, 2001).

Insgesamt konnten in den bisher untersuchten Vertebraten und Ectodysozoen zwei bis vier AS-C-Homologe identifiziert werden (Bertrand *et al.*, 2002; Ledent & Vervoort, 2001; Lee, 1997a), die sich generell ähnlicher sind als Vertreter der ARP-Gruppe und daher nicht in verschiedene Subfamilien unterteilt werden. Dieser Sachverhalt trifft auch auf die *Hydra*-AS-C-Gruppe zu, deren drei bisher identifizierte Homologe Cnash, LiAS und *Hydra* AS-C3 im Vergleich zu entsprechenden ARP-Homologen größere Ähnlichkeit untereinander zeigen. Trotzdem konnte in phylogenetischen Analysen innerhalb der AS-C-Gruppe eine 95 % unterstützte Verzweigung beobachtet werden, die Cnash und *Hydra*-AS-C3 von LiAS trennte. Während LiAS in der tiefer abzweigenden Gruppe große Ähnlichkeit zu *C. elegans* ASH, *Nematostella vectensis* Nem-23 und Maus Mash 3 zeigte, fielen in die andere Gruppe alle übrigen AS-C-Homologe mit den Cnidarier-Sequenzen an der Basis. Analog zur bereits besprochenen ARP-Gruppe zeigten auch AS-C3 und Cnash dort die größte Ähnlichkeit zu anderen Cnidarier-Sequenzen während sich die übrigen Metazoen getrennt gruppieren.

Aus unbekannten Gründen traten auch bei der ISH-Experimenten des *Hydra* AS-C-Homologs *hyAS-C3* ähnliche Schwierigkeiten auf wie weiter oben für die Expressionsanalyse der ARP-Gruppe beschrieben. Ähnlich zu *hyNgn* gaben einige Experimente mir *hyAS-C3*-Sonden Hinweise auf eine I-Zellassozierte Funktion (vgl. Anhang), bedürfen aber noch weiterer Bestätigung und wurden aus diesem Grund nicht in den Ergebnisteil aufgenommen. Wie auch in vorläufigen Ergebnissen mit *hyNgn* schien *hyAS-C3* in einer deutlich größeren I-Zellpopulation im Vergleich zu Cnash- und LiAS-positiven Nestern vertreten. Unter Vorbehalt könnte *Hydra* AS-C3 daher eine proliferierende I-Zellpopulation repräsentieren und möglicherweise

im Differenzierungsweg vor *Cnash* und *LiAS* als Selektorgen wirken. Sollte es nicht gelingen die ISH-Bediungenen entsprechend zu optimieren, könnte diese Hypothese durch einen anti-*Hydra* AS-C3 überprüft werden.

Im Gegensatz zu den Charakterisierungsproblemen der beschriebenen *Hydra*-bHLH-Faktoren konnte das AS-C-Homolog *LiAS* relativ problemlos untersucht werden. Dabei zeigten RNA-ISH-Ergebnisse, dass *LiAS* ebenso wie *Cnash* in nicht-proliferierenden Nematoblasten exprimiert wird. Damit scheinen beide Gene weniger an der Selektion der Nematocytenlinie sondern eher an deren Spezifizierung beteiligt zu sein. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob eines der anderen bHLH-Proteine die Rolle des Selektorgens übernehmen könnte. An dieser Stelle wäre es hochinteressant, fiele *hyAS-C3* diese Rolle zu, da unter diesen Umständen alle bekannten *Hydra*-AS-C-Homologe an einem der beiden neuronalen Differenzierungswege beteiligt wären. Könnten zusätzlich den ARP-Homologen Funktionen im Nervendifferenzierungsweg (NvDP) nachgewiesen werden, bestünde in *Hydra* eine ähnliche Arbeitsteilung zwischen den beiden neuronalen bHLH-Familien, wie sie zwischen Mitgliedern des AS-C und Atonal im PNS von *Drosophila* beobachtet werden kann (AS-C spezifiziert externe Sinnesorgane; Atonal unter anderem interne Sinnesorgane).

Abgesehen davon, das im NemDP bisher nur AS-C-Homologe beschrieben werden konnten, ist die Beziehung der einzelnen AS-C-Homologe zueinander unklar. Während in anderen Organismen die Abfolge von bHLH-Genen durch LOF-Experimente teilweise entschlüsselt wurde (Bertrand *et al.*, 2002; Hassan & Bellen, 2000; Kageyama & Nakanishi, 1997; Kageyama *et al.*, 2005; Lee, 1997b; Quan & Hassan, 2005), stehen entsprechende Methoden in *Hydra* noch nicht zur Verfügung bzw. werden gerade erst etabliert (Wittlieb *et al.*, 2006). Daher können zurzeit in Bezug auf die Wirkungsweise von *Cnash* und *LiAS* und ihre Stellung im NemDP nur Indizien (wie beispielsweise Nestgrößenanalysen) herangezogen und Vermutungen angestellt werden. Gesichert gilt, dass beide Gene postmitotisch und mit beginnender Differenzierung exprimiert werden.

Aus den bisherigen Befunden ergeben sich verschiedene Arbeitshypothesen, in denen beide AS-C-Homologe miteinander, nacheinander oder unabhängig voneinander zu Differenzierung von Nematocyten beitragen. In einem möglichen Szenario könnten beide Gene in einer überlappenden Kaskade wirken (Abb. D2a, S. 80), die schließlich zur Differenzierung der beiden Nematocytentypen Stenotelen und Desmonemen führt. Diese Hypothese verlangt zusätzliche unbekannte Faktoren die zur Unterscheidung von Stenotelen und Desmonemen beitragen bzw. parallel zur Spezifizierung der beiden Isorhizentypen führen. In einem anderen Modell könnten *Cnash* und *LiAS* parallel in getrennten Nematocyten-Subpopulationen wirken und so zur Spezifizierung der vier verschiedenen Subtypen beitragen (Abb. D2b, S. 80). Auch in diesem Fall müsste die Mitwirkung weitere Faktoren gefordert werden, die schließlich die einzelnen Nematocytentypen bzw. proliferierenden Stadien und differenzierende Stadien definieren.

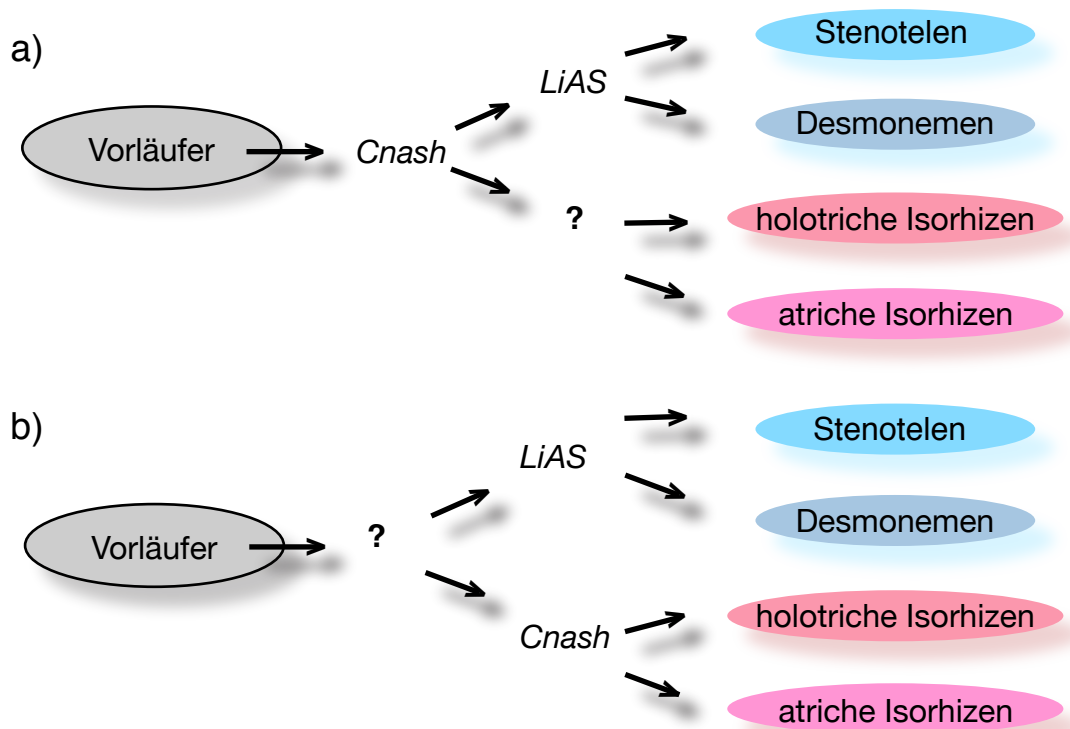


Abb. D2: Mögliche Stellung von *Cnash* und *LiAS* im NemDP

Zwei verschiedene Möglichkeiten zur Wirkungsweise der beiden AS-C-Gene in *Hydra*: In (a) agiert *Cnash* vor *LiAS* und ein unbekannter Faktor koordiniert die Spezifizierung der beiden Isorhizentypen. In (b) könnten beide AS-C-Gene getrennt zur Spezifizierung der vier Nematocytentypen beitragen. Details siehe Text

Mögliche und viel versprechende Kandidaten für die oben postulierten unbekannten Faktoren wären Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, denen bereits von Quan und Kollegen (Quan *et al.*, 2004) eine entscheidende Rolle im Spezifizierungsvorgang durch bHLH-Faktoren zugeschrieben wurde und ebenfalls in der Myogenese (Leptin, 1991) als Regulatoren von bHLH auftreten. Die enge Verknüpfung dieser beiden Transkriptionsfaktor-Familien ergibt sich unter anderem durch sehr ähnliche DNA-Binde-Motive, wodurch die zeitlich koordinierte Aktivierung von bHLH und Zinkfinger-Proteinen mit Konkurrenz um DNA-Bindemotive verbunden ist und zur Aktivierung bzw. nicht-Aktivierung von bestimmten genetischen Programmen führen könnte (Bellefroid *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006). Da *Hydra* über ein breites Spektrum von unterschiedlichen Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren verfügt, erscheint eine koordinierte Aktion mit bHLH-Faktoren plausibel, insbesondere, da viele der bekannten *Hydra* Zinkfinger in unterschiedlichen I-Zellnestern exprimiert werden (Technau, unveröffentlicht; Technau persönliches Gespräch).

Um diesen unterschiedlichen Hypothesen nachzugehen wäre es zunächst wichtig die Expressionsdomänen von *Cnash* und *LiAS* im selben Tier zu vergleichen. Bedauerlicherweise konnten in diese Richtung durchgeführte Doppel-ISH-Experimente im Rahmen dieser Arbeit nicht für beide bHLH-Gene optimiert werden. Daher liegt auch hier die Hoffnung auf einem anti-*Cnash*-Antikörper, der die Expressionsdomänen auf Proteinebene vergleichbar machen würde. Ein

solcher monoklonaler Antikörper wird zurzeit in der Gruppe von Angelika Böttger (München, persönliches Gespräch) etabliert und befindet sich in der Testphase. Mit diesem Antikörper wäre es zusätzlich möglich die Cnash Expression im Tentakelnervennetz, die von Hayakawa und Kollegen (Hayakawa *et al.*, 2004) beschrieben wurde zu bestätigen was bisher auf ISH-Ebene nicht gelang.

2. Eine nähere Betrachtung des neuen *Hydra* AS-C Homologs LiAS

In BrdU-Experimente zeigte sich, dass LiAS in postmitotischen, differenzierenden Nestern exprimiert wird und ein weiteres Gen des NemDP darstellt. Darüber hinaus konnte bereits auf RNA-ISH-Ebene eine Verbindung zwischen LiAS und Stenotelen nachgewiesen werden, die in späteren Antikörperfärbungen bestätigt wurde. Damit gelang es erstmals ein bHLH-Protein in *Hydra* mit einem bestimmten Zelltyp zu assoziieren und LiAS als Spezifizierungsgen einzuordnen. Darüber hinaus konnten speziell in Immunfärbungen mit LiAS-Antikörper filamentartige Strukturen um Kapselvesikel und Zellkern beobachtet werden, die an die so genannten Nematocytenfilamente (Nf) (Wood & Novak, 1982) erinnern und möglicherweise Hinweise auf eine duale Funktion von LiAS geben .

2.1. LiAS im Nematocyten Differenzierungsweg (NemDP)

Bei der Auswertung von LiAS-ISH-Experimenten konnten morphologisch zwei unterschiedliche LiAS-positive Nest-Typen beobachtet werden, die sich in ihrer Größe und Ausprägung der cytoplasmatischen Verbindungen unterschieden. Diese Ergebnisse ließen zwei mögliche Interpretationen zu: (i) beide Nest-Typen stellen unterschiedliche Differenzierungsstadien eines Nematocyten Typs dar, (ii) die unterschiedlichen Nester repräsentierten unterschiedliche Nematocyten Typen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der anti-LiAS-Antikörperfärbung erscheint die letztgenannte Hypothese zuzutreffen, da sowohl Stenotelen als auch Desmonemen mit anti-LiAS Antikörper nachgewiesen wurden.

Ein gewisser Widerspruch zu dieser Hypothese ergibt sich Doppelmarkierungsexperimenten mit BrdU, in denen kein deutlichen Hinweise auf zwei unterschiedliche Populationen beobachtet werden konnten. Da Stenotelen und Desmonemen über abweichende Differenzierungszeiten verfügen, sollte sich die Anwesenheit von Desmonemen mit einem steilen Anstieg gefolgt von einem Knick der Markierungskurve und einem anschließenden flacheren Kurvenverlauf nach der Knickstelle äußern. Überraschenderweise scheint jedoch die ermittelte Markierungskurve linear und auch im Vergleich mit bekannten Literaturwerten (Campbell, 1967; Campbell & David, 1974; David & Gierer, 1974) auf eine Zellpopulation mit gleicher Markierungskinetik bzw. auf Stenotelen hinzudeuten. In diesem Zusammenhang müssen weitere Versuche mit engeren Zeitfenstern zur Klärung dieses scheinbaren Widerspruchs beitragen.

Weiterhin wurden Unterschiede in der Signalverteilung zwischen LiAS RNA-Signalen und Antikörperfärbungen beobachtet. Während LiAS-ISH Markierungen nur im Rumpf und ausschließlich in Nestern beobachtet wurde, konnte mit polyklonalem anti-LiAS Serum zusätzlich reife Nematocyten in Tentakel und Körpersäule sowie zerfallende Nester detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die LiAS-Expression nach der letzten Mitose beginnt und bis zum Zerfall der cytoplasmatischen Verbindungen anhält. Anschließend bleibt das Protein bis in reife und integrierte Stadien nachweisbar. Dabei wurden punktförmige Signale als erste Anzeichen des Proteins gewertet, die scheinbar im Laufe der Differenzierung über schlauch- oder birnenförmige Signale in Nähe des Zellkerns zu den charakteristischen Filamenten bzw. kissenförmigen Signalen führten.

Interessanterweise konnten nicht in allen diesen Entwicklungsstadien anti-LiAS-Signale im Nukleus nachgewiesen werden und die Mehrheit anti-LiAS-positiver Zellen zeigt Signale außerhalb des Zellkerns. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass LiAS weitere Funktionen innerhalb der Zelle bzw. im Laufe der Nematocyten-Differenzierung ausüben könnte, die mit den beobachteten Filamenten und kissen- bzw. ringförmigen Strukturen in Zusammenhang stehen. Allerdings ist die oben genannte Abfolge einzelner anti-LiAS-positiven Stadien hypothetisch und nur der Endpunkt (migrierende und ins Epithel integrierte Nematocyten) ist klar definiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die beobachteten Signale Entwicklungsunterschiede zwischen Stenotelen und Desmonemen darstellen. Bedauerlicherweise konnte dieser Frage aus technischen Gründen (Kombination von DIC-Kontrast mit confokalen-Aufnahmen) bislang nicht nachgegangen werden.

Da LiAS-ISH-Signale nur in Nestern auftraten während das Protein noch nach Zerfall der Nester in migrierenden und reifen Nematocyten zu beobachten war, muss für das Protein eine entsprechende Halbwertszeit gefordert werden. Bezieht man den Zellzyklus und die Differenzierungszeit von typischen Stenotelen (etwa 96 h) und die geschätzte Wanderungszeit (etwa 72 Tage) mit ein, kann für LiAS eine ungefähre Halbwertszeit ca. 36 h geschätzt werden. Zu einem ähnlichen Wert gelangten auch Proteinanalyseprogramme (PSORT), die basierend auf der LiAS-Aminosäuresequenz eine Halbwertszeit von etwa 30 h errechneten. Diese scheint für einen Transkriptionsfaktor erstaunlich hoch, könnte jedoch ein weiteres Indiz für zusätzliche Funktionen des Proteins sein, die eine solche Halbwertszeit voraussetzen und/oder ermöglichen.

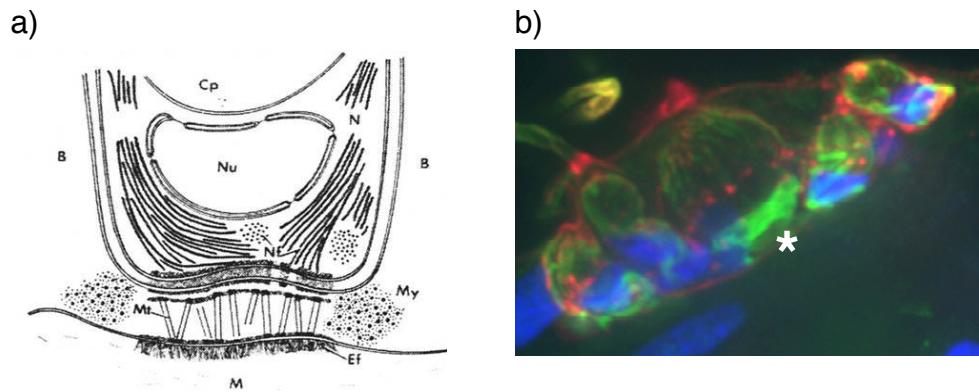


Abb. D3: Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea-Komplex (NBM) nach Wood & Novak (1982)

In (a) ist die schematische Darstellung des NBM aus Wood & Novak (1982) gezeigt, die eine Zusammenfassung der Ultrastrukturdaten darstellt. In dieser Skizze symbolisiert Cp das Kapselvesikel, Nu den Kern, B die umgebende Batteriezelle, M die Mesogloea und Nf Nematocytenfilamente. Diese Nematocytenfilamente sind hier für den basalen Bereich einer Stenotele gezeigt, umschließen aber auch das Kapselvesikel. Diese Filamente scheinen gut mit LiAS-Antikörperfärbungen übereinzustimmen (b): exemplarisch an einer Spinning Disk 3D-Rekonstruktion gezeigt, sind neben dem auffälligen LiAS Patch in der zentralen Stenotele (grün, Sternchen) Filamente zuerkennen, die basal beginnen und das Kapselvesikel umfassen. In rot die Q94 Co-Färbung und in blau die Kerne von Nematocyten und Batteriezelle.

2.2. Mögliche Funktion von LiAS in Stenotelen und Desmonemen

Bislang wurden bHLH- Proteine der AS-C-Familie als Transkriptionsfaktoren beschrieben, daher war es überraschend LiAS-Protein in vielen Differenzierungsstadien außerhalb des Kerns vorzufinden, wo es an Filamente und Zell-Zellverbindungskomplexe erinnerte (Abb. D3). Die ersten Interpretation dieser Resultate reichte von zufälligen Artefakten bis zu einer dualen Funktion des Proteins. Schrittweise konnte jedoch unspezifische Kreuzreaktionen durch Konkurrenzexperimente mit rekombinantem LiAS-Protein und Immunfärbungen mit affinitätsgereinigtem anti-LiAS-Serum (siehe Anhang) ausgeschlossen werden. Da weiterhin LiAS-ISH-Ergebnisse die Resultate der anti-LiAS-Antikörperfärbung unterstützen, scheinen die beobachteten anti-LiAS-Signale spezifisch.

Um die beschriebenen anti-LiAS-positiven Signale außerhalb des Zellkerns zellulär einzuordnen, wurden verschiedene Co-Färbungen mit membran-spezifischen (Q94) und β -Tubulin-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei entstand der Eindruck, dass anti-LiAS-positive Signale Zellmembran-nah lokalisiert waren. Zusätzlich konnte in anti- β -Tubulin-Co-Färbungen eine polare Verteilung beider Signale beobachtet werden. Durch die Auswertung von confocal aufgenommen Stenotelen-Bilderstapeln (vgl. Abb. R17, S. 46; R18, S. 47) zeigte sich, dass anti- β -Tubulin- und anti-LiAS-Signale in diesen Zellen an entgegengesetzten Zellpolen konzentriert vorlagen, was besonders deutlich in migrierenden und integrierten Zellen beobachtet werden konnte. Dabei kennzeichnete das anti- β -Tubulin-Signal einen apikalen Korb oberhalb des Kapselvesikels, während anti-LiAS kissenförmige Signal am entgegengesetzten Zellpol (basal) nahe der Mesogloea zusammen mit einigen apikal orientierten Filamenten um Kapselvesikel und Zellkern zeigte (vgl.

Abb. D3, S. 83). Dabei konnten im Bereich des anti- β -Tubulin-positiven Korbs einige anti-LiAS-positive Filamente in engerer Nachbarschaft zu Mikrotubuli beobachtet werden, die jedoch erschien im Vergleich zum β -Tubulin-Korb aus feiner und unregelmäßiger aufgebaut schienen.

Die beschriebenen Beobachtungen erinnern in Position und Charakter der Signale teils an Strukturen, die von Wood und Novak als Nematocytenfilamente (Wood & Novak, 1982) bezeichnet, jedoch nie näher charakterisiert wurden (Abb. D3a, S. 83) und teils an anti-Hydra-Tropomyosin-Färbungen (Lopez de Haro *et al.*, 1994), die jeweils im Zusammenhang mit der Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea (NBM) Verankerungskomplex stehen. LiAS könnte daher neben einer Funktion als Transkriptionsfaktor an der Positionierung des Kapselvesikels und/oder der Verankerung von Stenotelen und Desmonemen indirekt oder direkt beteiligt sein.

Des Weiteren entstand in Maximumprojektionen von Batteriezellen mit Nematocyten der Eindruck, dass die weiter oben beschriebenen kissenförmigen Signale in Stenotelen aus mehreren Ringen oder einer Spirale bestehen könnten (vgl. Abb. R19, S. 48). Ähnliche ringförmige Strukturen sind im Zusammenhang mit Zell-Zellverbindungen bekannt und konnten auch in einzelnen Stenotelen im Rumpf der Tiere beobachtet werden (Abb. R17, S. 46). Die Tatsache, dass diese Strukturen bisher nur in integrierten Nematocyten und nicht in migrierenden Zellen beobachtet werden konnte, bestärkte die Vermutung, dass LiAS eine Komponente des Nematocyten-Verankerungskomplex sein könnte. In diesem Zusammenhang könnte auch die nachgewiesene Interaktion mit der cytoplasmatischen *Hydra* Cadherin-Domäne von Bedeutung sein, die gleichzeitig die membrannähe Lokalisation der anti-LiAS-Signale erklären könnte.

Neben einem Verankerungsaspekt könnte LiAS auch an der Migration von ausdifferenzierten Stenotelen und Desmonemen und dem Zerfall reifer Nematocyten-Nester beteiligt sein. Ein entsprechender Zusammenhang zwischen AS-C-Homologen und dem Migrationsverhalten von Zellen wurde bereits im Kontext der Migration von Neuralleistenzellen in Maus und Gonaden Leitzell-Wanderung in *C. elegans* gezeigt (Lo *et al.*, 1991; Sommer *et al.*, 1995; Tamai & Nishiwaki, 2007). Gleichzeitig könnte auch die Interaktion mit *Hydra* Cadherin funktionell mit dem Zerfall reifer Nester und der Wanderung von Nematocyten in Zusammenhang stehen.

3. Mögliche Bedeutung der LiAS/Cadherin Interaktion

Cadherine sind Typ I Transmembranproteine, vermitteln Calcium-abhängige Zelladhäsion und sind am Aufbau synaptischer Zell-Zellverbindungen und der Wegfindung bzw. dem Migrationsverhalten einiger Zelltypen beteiligt (Bruses, 2000; Bruses, 2006; Derycke & Bracke, 2004; Huntley, 2002; Huntley *et al.*, 2002; Mariotti *et al.*, 2007; Solnica-Krezel, 2006; Takeichi & Abe, 2005; Tepass, 1999). Verschiedene aktuelle Studien zeigen weiterhin, dass Cadherine durch regulierte

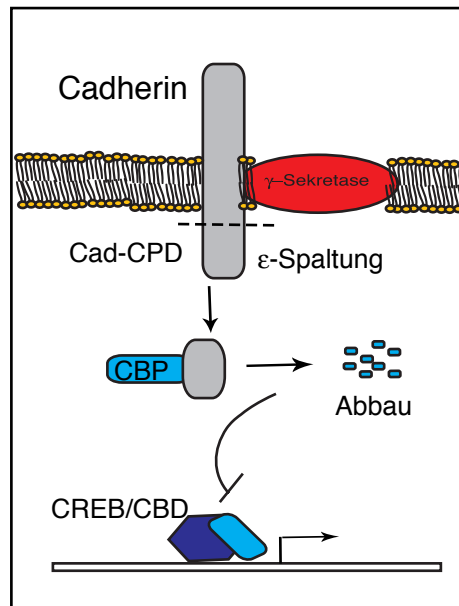


Abb. D4: Schema der γ -Sekretase-Spaltung von Cadherin und Auswirkungen auf CBP (nach Marambaud, 2003)

Cadherin (grau) wird von einem γ -Sekretase-Komplex (rot) prozessiert. Durch ϵ -Spaltung wird die cytoplasmatische Domäne von Cadherin (Cad-CPD) freigesetzt und kann mit einer Komponente des CREB/CBP-Komplex interagieren. Diese Interaktion führt zum Abbau von CBP und damit zur Inhibition CREB/CBP-abhängiger Genexpression als Antwort auf cAMP Signaltansduktionssignale. (Details siehe Text)

Intramembran Proteolyse (RIP) ähnlich wie Notch prozessiert werden können (Baki *et al.*, 2001; Georgakopoulos *et al.*, 1999; Georgakopoulos *et al.*, 2000). Dabei führt die Assoziation mit einem γ -Sekretase Komplex, der aus den Hauptkomponenten Presenilin (PS1) und Nicastrin aufgebaut ist, zur Freisetzung der cytoplasmatischen Domäne entsprechend prozessierter Proteine.

Im Falle von Maus N-Cadherin (N-Cad) konnte weitherhin gezeigt werden, dass diese freigesetzte cytoplasmatische Domäne in der Lage ist CBP/CREB vermittelte Aktivierung von Genen zu inhibieren (Abb. D4), in dem sie mit CBP interagiert und zu dessen Abbau führt (Marambaud *et al.*, 2003; Rao & Finkenbeiner, 2003). Gleichzeitig verändert die Prozessierung von Cadherin durch RIP die Zelladhäsionseigenschaften der betroffenen Zelle und führt zu einer Destabilisierung der Cadherin/Cytoskelett-Verbindung innerhalb der Zelle (Bruses, 2006; Georgakopoulos *et al.*, 2000; Marambaud & Robakis, 2005; Marambaud *et al.*, 2002; Uemura *et al.*, 2004). Da die freigesetzte cytoplasmatische Cadherin-Domäne gleichzeitig ein Interaktionspartner von β -Catenin ist, wird über die Veränderung der cytoplasmatischen β -Catenin Konzentration ebenfalls Einfluss weitere Signalwege genommen (z.B. wnt-Signaltransduktion).

Vor diesem Hintergrund und im Zusammenhang mit der Identifizierung der Hauptkomponenten des γ -Sekretase-Komplex (PS1 und Nicastrin) in *Hydra* (Marion Veit, Diplomarbeit 2006), bot die im Hefe-THS und durch biochemisch Methoden bestätigte Proteininteraktion zwischen der cytoplasmatischen Domäne von *Hydra* Cadherin und LiAS eine Fülle von Interpretationsmöglichkeiten. Ein

hochinteressanter Aspekt dieser Interaktion bestand dabei in einem möglichen und bislang nicht beschriebenen Regulationsmechanismus von bHLH-Faktoren durch prozessiertes Cadherin mit Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der betroffenen Zellen.

3.1. Regulation von LiAS durch Interaktion mit Cadherin-Spaltprodukt?

Von Marambaud und Kollegen (Marambaud *et al.*, 2003) wurde gezeigt, dass die Interaktion von CBP mit der prozessierten cytoplasmatischen Domäne von N-Cad zur Ubiquitinierung von CBP und damit zur Hemmung der CBP/CREB-vermittelten Transkription als Antwort auf „cAMP-Signaling“ führt (Abb. D4). Daher stellte sich die Frage, ob ein ähnliches Szenario auch im Zusammenhang mit der Cadherin/LiAS-Interaktion zutreffen und in ähnlicher Weise zum Abbau von LiAS führen könnte. Leider stehen der Überprüfung dieser Hypothese in *Hydra* zurzeit einige methodische Hindernisse im Weg, wie beispielsweise das Fehlen von „Gain of function“ (GOF)-/„Loss of Function“ (LOF)-Mutanten. Jedoch sind im Zusammenhang mit Presenilin (PS1) und dem γ -Sekretase-Komplex verschiedene Inhibitoren bekannt, die eine Spaltung von *Hydra*-Cadherin verhindern könnten. Sollte also die Interaktion der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne mit LiAS zum Abbau von LiAS führen, würde der Einsatz von γ -Sekretase-Inhibitoren die Cadherinspaltung inhibiert und LiAS folglich stabilisiert. Dies wiederum könnte Hinweise auf einen möglichen Regulationsmechanismus von bHLH-Proteinen durch RIP induzierte Cadherin-Spaltung geben.

Von unterschiedlichen Inhibitoren erwies sich in *Hydra* speziell DAPT als wirkungsvoll und inhibiert die Prozessierung von Membranprotein durch den γ -Sekretase Komplex (Käsbauer *et al.*, 2007). Käsbauer und Kollegen zeigten, dass bei der Inkubation von Hydren in DAPT-haltigem Medium Differenzierungsdefekte von I-Zellprodukten auftraten. Sie führten diese Effekte auf die Inhibition des Notch-Signalweges zurück, welcher ebenfalls durch DAPT inhibiert wird. Einige der beobachteten Effekte waren der Verlust von *Cnash*-positiven ISH-Signale und weitere Anomalien in der Nematocytenentwicklung, während gleichzeitig die Nervenzellentwicklung unbeeinflusst blieb.

Vor dem Hintergrund der möglichen Cadherin-Spaltung wurden die DAPT-Inhibitorexperimente wiederholt und anschließend mit anti-LiAS und anti-Cad-ICD-Immunfärbungen kombiniert. Bei der Auswertung dieser ersten Experimente konnten Effekte beobachtet werden, die jedoch noch weiterer Bestätigung bedürfen und daher nicht in den Ergebnisteil dieser Arbeit aufgenommen wurden (siehe Anhang). Bei einer ersten Auswertung dieser Versuche fiel auf, dass durch die Inkubation mit DAPT die verschiedenen anti-LiAS-positiven Neststadien im Rumpf verschwanden und nach einigen Tagen nur noch reife Nematocyten beobachtet werden konnte. Gleichzeitig konnte nach mehreren Tagen (72 h - 96 h Inkubation mit DAPT) nematocyten-freie Bereiche an der Tentakelbasis beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen in erster Linie einen Effekt der γ -Sekretase- Inhibition durch DAPT auf den Nematocyten-differenzierungsweg und NemDP-assoziierte Gene wie *Cnash* und *LiAS*. Interessant scheint weiterhin die in einigen Tieren beobachteten nematocytenfreien Bereiche an der Tentakelbasis. Da in diesen Tieren reife Nematocyten vorlagen, besteht die Möglichkeit, dass DAPT nicht nur Effekte auf die Differenzierung von Nematocytennestern sondern auch auf das Migrationsverhalten von bereits differenzierten Zellen ausübt. Parallel durchgeführte Immunfärbungen mit anti-HyCad-ICD (Peptidantikörper gegen die intrazelluläre Domäne) zeigten ebenfalls gewisse Veränderungen im Cadherin-positiven Nervenetz (siehe Anhang), die aus oben genannten Gründen ebenfalls nicht in den Ergebnisteil aufgenommen wurden. Unter den genannten Einschränkungen entstand in ersten Auswertung der Eindruck, dass die Vernetzung anti-Cadherin-positiver Nervenzellen untereinander durch Inkubation von DAPT beeinflusst wird und sich anti-HyCad-ICD-Signale auf den Bereich des Somas bzw. auf Zell-Zellkontaktstellen zurückziehen: So erschienen beispielsweise Axone im Vergleich mit Kontrollen nicht mehr durchgängig gefärbt, sondern erinnerten in einzelnen Teilbereichen an Perlenschnüre.

Neben den Effekten auf anti-*LiAS* und anti-HyCad-ICD-Immunfärbungen wurden auch generelle morphologische und physiologische Veränderungen der Tiere beobachtet. Beispielsweise verkürzen sich die Tentakel von DAPT-behandelten Tiere innerhalb weniger Tage drastisch, wobei einige Tiere im Rumpf verlängert erschienen (im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren etwa 1/3 bis doppelt so lang). Gleichzeitig konnte nach 24 bis 36 h Änderungen im Fressverhalten beobachtet werden: während Kontrolltiere keine Auffälligkeiten zeigten, konnten DAPT-behandelte Tiere keine oder kaum Artemien fangen, obwohl Nematocyten im Tentakel beobachtet werden konnten. Teilweise beschränkte sich Bereich abgefeuerter Nematocyten auf die Tentakelspitzen, jedoch schien die Tentakel/Hypostom-Koordination der meisten Tiere beeinträchtigt.

Die größte Schwierigkeit bei der Beurteilung dieser Daten liegt in der Unterscheidung von Notch- und Cadherin-abhängigen Effekten. Da DAPT ein genereller Inhibitor der γ -Sekretase Aktivität ist, werden gleichzeitig die Spaltung von Notch und Cadherin inhibiert. Es ist daher möglich, dass die von Käsbauer und Kollegen beschriebenen Auswirkungen auf den NemDP nicht ausschließlich auf die Inhibition des Notch-Signalweges, sondern auf die Inhibition der Cadherin-Spaltung zurückzuführen sind. Selbstverständlich ist es ebenso möglich, dass der beobachtete Einfluss von DAPT auf die anti-*LiAS*-Immunfärbung auf einer Störung des Notch-Signalweges beruht oder sekundärer, durch die Störung von *Cnash* hervorgerufen werden. Gleichzeitig scheinen durch die Inhibition des γ -Sekretase-Komplexes weitere Signalwege gestört die sich ebenfalls auf den NemDP auswirken könnten.

Andererseits spricht die in dieser Arbeit belegte Interaktion zwischen *LiAS* und der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne sowie eine Verbindung zwischen Cadherin und der Hauptkomponente des γ -Sekretase-Komplex dafür, dass die Cadherin Spaltung für den NemDP von Bedeutung sein könnte und ihre Inhibition zu

Veränderungen im Differenzierungsmechanismus von Stenotelen und Desmonemen führt. Dabei bleibt vorerst unklar, ob die Interaktion ähnlich wie im Falle von CBP zu Ubiquitinierung und Abbau von LiAS führt oder andere Konsequenzen hat. Wie bereits angedeutet muss zur Klärung dieses Fragekomplexes das bereits bestehende Methodenspektrum in *Hydra* erweitert werden.

3.2. Mögliche Funktion der LiAS/Cadherin Interaktion

Neben dem weiter oben beschriebenen Einfluss der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne auf die Stabilität von Proteinen, sind Cadherine Verbindungspunkte zwischen Cytoskelett und Zellmembran sowie Bestandteile von Zell-Zellkontakten. In diesem Zusammenhang könnte die Interaktion der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne mit LiAS verschiedene Ebenen besitzen und die weiter oben beschriebene Membran- assoziierte Lokalisation des anti-LiAS-Antikörpersignals erklären. Da der Interaktionsbereich beider Proteine die β -Catenin-Bindestelle von *Hydra*-Cadherin umfasst, könnte LiAS durch Interaktion mit Cadherin & der Zellmembran (i) die zelluläre Konzentration von β -Catenin erhöhen und (ii) die Verbindung von Cadherin und Cytoskelett beeinflussen. Diese Möglichkeiten verbinden LiAS nicht nur mit dem oben beschriebenen NBM-(Nematocyten-Batteriezell-Mesogloea) Komplex sondern könnten gleichzeitig Querverbindungen zu β -Catenin abhängigen Signalwegen sein, die wiederum zu Veränderungen im Expressionsprogramm der betreffenden Zell führen könnten.

Bezüglich einer Nematocytenverankerungsfunktion könnten die basalen kissen- bzw. ringförmigen anti-LiAS-Signale in Stenotelen Verbindungsstellen des NBM-Komplexes darstellen, an denen auch Cadherine beteiligt sind. Allerdings konnten in den Tentakeln keine entsprechenden ringförmige anti-Cadherin-positiven Strukturen sondern mehr flächige „Flecken“ beobachtet werden, die wiederum mit anti-LiAS-Signalen kolokalisiert werden konnten. Um eine eindeutige Verbindung zwischen LiAS und dem NBM-Komplex herzustellen und die Struktur anti-LiAS-positiver Signale weiter aufzuklären, muss die Auflösung der mikroskopischen Aufnahmen verbessert werden, wozu beispielsweise elektronenmikroskopische Aufnahmen beitragen könnten. In diesem Zusammenhang sind auch erstmalig beobachtete Verbindungen zwischen anti-Cad- ICD-positiven Nerven und Nestern im Rumpf von Interesse (Abb. D5), die teilweise in kleinen ringförmigen Strukturen enden. Diese Strukturen ähnelten zum Teil den weiter oben beschriebenen ringförmigen anti-LiAS Signalen und könnten möglicherweise an der Verankerung von Nematoblasten im Gewebe beteiligt sein. Leider ließen sich die Immunfärbungsprotokolle von anti-HyCad-ICD und anti-LiAS bislang nicht derart aneinander anpassen, dass Co-Färbung mit beiden Antikörpern möglich wäre.

Eine weitere mögliche Funktion der LiAS/Cadherin-Interaktion steht im Zusammenhang mit der beobachteten parallelen Orientierung von migrierenden Stenotelen entlang anti-Cadherin-positiven Nervenzellen: diese Orientierung erweckte den Eindruck, dass anti-Cad-ICD-positiven Nervenzellen an der gerichteten

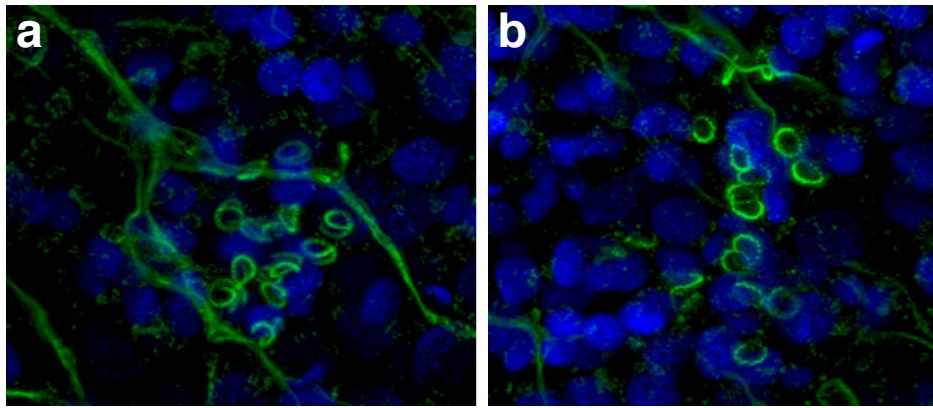


Abb. D5: anti-HyCad-ICD erkennt ringförmige Strukturen in I-Zell-Nestern

Ähnlich wie a-LiAS erkennt auch anti-HyCad-ICD ringförmige Strukturen in Nematocyten-Nestern. Diese Strukturen schienen oft in unmittelbarer Verbindung zu anti-Cadherin-positiven Nervenzellen. (Details siehe Text)

Wanderung von Nematocyten beteiligt sein könnten. Auch hier könnte die Interaktion zwischen LiAS und Cadherin eine bisher unklare Funktion übernehmen. Beispielsweise könnte LiAS durch seine Interaktion mit der intrazellulären Cadherin-Domäne die Zelle „mobilisieren“, in dem die Stabilität der Zell-Zellkontakte beeinflusst wird oder der Startpunkt der Zellmigration mit den Differenzierungsprozessen der Zelle koordiniert wird. Es scheint plausibel, dass bHLH -Faktoren direkt oder indirekt die Regulation von Zell-Zellverbindungen und Migrationsverhalten beeinflussen, da ähnliche Vorgänge in Verbindung mit neuronaler Vorläufersektion beschrieben sind. Beispielsweise schließt sich in *Drosophila* der Expression von proneuralen bHLH-Faktoren die Delamination von neuronalen Vorläuferzellen aus zuvor etablierten proneuralen Zell-Clustern an. Daher könnte auch LiAS durch Wechselwirkung mit *Hydra* Cadherin im Laufe der Differenzierung von Desmonemen und Stenotelen die Stabilität von Zell-Zellverbindungen beeinflussen und zum Zerfall der syncytialen Nester bzw. dem Migrationsverhalten reifer Nematocyten beitragen.

Aus den bisher angerissenen Themen zeigt sich, dass die auf den ersten Blick merkwürdig anmutende Interaktion eines bHLH-Proteins mit der intrazellulären Domäne von *Hydra* Cadherin zu hoch interessanten Spekulationen führt (vgl. Abb. D6): (i) Erstens könnte es sich um einen Regulationsmechanismus von LiAS durch RIP-vermittelte Cadherin-Spaltung handeln. Falls dies ähnlich wie für CBP beschrieben zum Abbau von LiAS führen würde, könnten freiwerdende DNA-Bindemotive von anderen Faktoren (z.B. Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren) genutzt werden, die ihrerseits auf die Genexpression wirken. Zeitgleich stünde der ubiquitäre exprimierte Klasse I Dimerisierungspartner von LiAS für andere Interaktionen zu Verfügung. (ii) Da LiAS und β -Catenin an den gleichen Abschnitt der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne binden, könnte sich eine Interaktion mit LiAS und Cadherin wie weiter oben angedeutet auf die Stabilität von Zell-Zellverbindungen, die Morphologie von Zellen und auf die intrazelluläre Verteilung von β -Catenin auswirken. Auf diese Weise würden zeitgleich Querverbindungen zu anderen Signalwegen und nachgeschalteten Genexpressionsgruppen hergestellt.

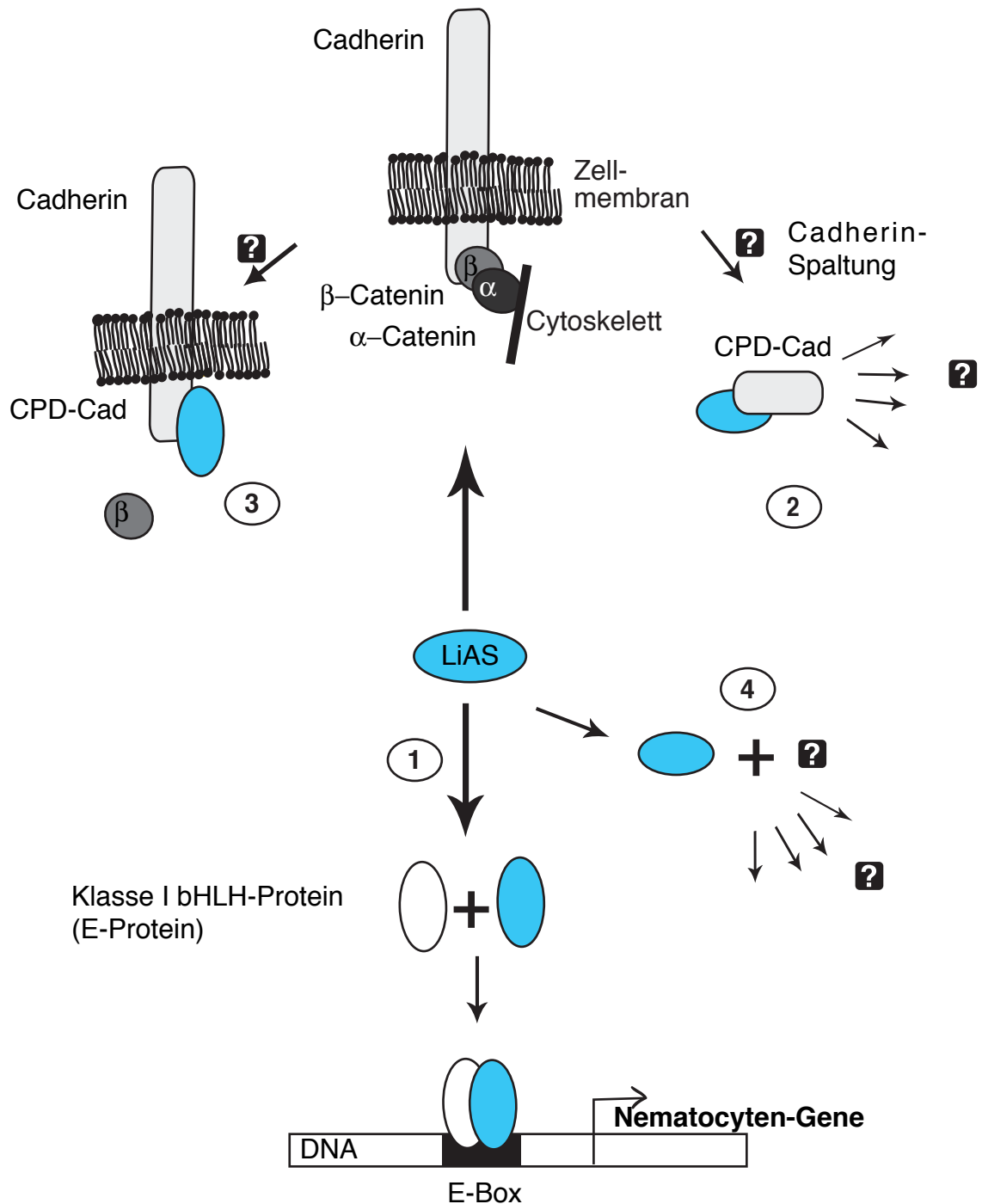


Abb. D6: Schematische Zusammenfassung möglicher LiAS-Funktionen

Das Schema fasst mögliche LiAS Funktionen innerhalb von Stenotelen und Desmonemen zusammen. (1) Es ist anzunehmen, dass LiAS wie andere bHLH-Faktoren Heterodimere mit ubiquitären E-Proteinen (z.B.: *Hydra* Daughterless) und anschließend an E-Box-Motive bindet, um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. Die Interaktion mit der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne (CPD-Cad) könnte sich auf mehreren Ebenen auswirken: Setzt man eine Spaltung von Cadherin und die Freisetzung von CPD-Cad ins Cytoplasma voraus (2), könnte die Interaktion zum Abbau von LiAS führen, ähnlich wie sie für CBP beschrieben wurde. Falls Cadherin nicht prozessiert wird (3) könnte LiAS mit β -Catenin um die cytoplasmatische Domäne von Cadherin konkurrieren, wodurch möglicherweise die Stabilität der Cytoskelett/Zellmembran oder Zell-Zell-Verbindungen modifiziert werden und gleichzeitig die intrazelluläre β -Catenin-Konzentration erhöht werden könnte. (4) Es besteht die Möglichkeit, dass LiAS mit weiteren noch nicht identifizierten Faktoren interagiert und so an der Positionierung des Kapselvesikels und der Zellverankerung beteiligt ist. (Details siehe Text)

Ob und wenn ja, wie genau die LiAS/Cadherin-Interaktion Einfluss auf die Migration und Integration von Nematocyten hat, kann zwar mit den zurzeit verfügbaren Methoden in *Hydra* nicht hinreichend geklärt werden, doch die Summe der Beobachtungen ist ein Indiz für eine funktionelle Querverbindung zwischen bHLH-Faktoren und Cadherin. Damit scheint LiAS neben einer Aufgabe in Zellkern zusätzliche Funktionen innerhalb der Zelle auszuüben. Dabei könnte die Assoziation mit Cadherin einen Teil der ungewöhnlichen Proteinverteilung (anti-LiAS-positive „Kissen“) erklären, während die Natur der anti-LiAS-positiven Filamente weiterer Klärung bedarf und möglicherweise auf weitere Interaktionspartner hinweisen könnte.

4. Renaissance eines Modelorganismus

Nicht zuletzt Dank der Fortschritte des *Hydra*-EST und -Genomprojekts befindet sich das Bild des Süßwasserpolyphen *Hydra* im Wandel (Bosch, 2003; Bosch, 2007; Fujisawa, 2006; Steele, 2002; Steele, 2006). Beginnend mit dem Körperbauplan, gelang es beispielsweise Shimizu *et al.* (Shimizu *et al.*, 2007) eine bislang unentdeckte Körperöffnung zu beschreiben, die nicht nur Kopf- und Fußnervennetz in neuem Licht erscheinen lässt, sondern auch die Expressionsdomänen verschiedener Gene wie z.B. dem *Hydra* Brachyury-Homolog (HyBra). Ebenfalls deuten die Studien von Fujisawa, Koizumi und anderen darauf hin, dass das *Hydra*-Nervennetz strukturierter ist als bislang angenommen. Vor diesem Hintergrund sind Mechanismen und Faktoren, die zur Etablierung neuronaler Zellen und deren Differenzierung führen von besonderem Interesse.

In diesem Zusammenhang führte die Suche nach Transkriptionsfaktoren der neuronalen bHLH-Familien AS-C und ARP zu bislang unbekannten *Hydra*-Homologen und zeigte zusammen mit aktuellen Ergebnissen aus *Nematostella vectensis* (Watanabe, Bertulat, Fujisawa, Holstein in Vorbereitung; Simionato *et al.*, 2007), dass ein bHLH-System mit Vertretern der AS-C- und ARP-Familie bereits in den Anfängen der Nervensystementwicklung in Cnidariern vorlag. Die Aufklärung des bHLH-Netzwerks in diesem alten Phylum bietet die Möglichkeit evolutionäre Zusammenhänge offen zu legen und vielleicht auch eine gemeinsame Urfunktion neuronaler bHLH abzuleiten.

Eine mögliche „Urfunktion“ von ARP- und AS-C-Faktoren könnte mit Sekretion im weitesten Sinne verknüpft sein: Einerseits regulieren AS-C- und ARP-Homologe in Vertebraten die Differenzierung von neurosekretorischen Zellen und sekretorischen Organen wie z. B. Pankreas, Schilddrüse und Epiphyse und Speicheldrüsen (Cau & Wilson, 2003; Harb *et al.*, 2006; Jenny *et al.*, 2002; Kameda *et al.*, 2007; Kele *et al.*, 2006; Kokubu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2002) andererseits können auch Nematocyten als hochspezifizierte sekretorische Zellen eingestuft werden. Könnte daher die Entwicklung von Nervensystemen im Zusammenhang mit der Evolution spezieller sekretorischer Zellen stehen, die sich unter dem Einfluss von AS-C- oder ARP-Homologe entwickelt haben? Kann eine neuronale Zelle auf ihre sekretorische

Funktion reduziert werden? Würde das bedeuten, dass Organe wie Speicheldrüsen und Pankreas einstmals aus einem Vorfahren von neuronalen Strukturen entstanden? Oder ist dies ein Fall von Analogie und es besteht zwar Ähnlichkeit, doch kein echter oder haltbarer Zusammenhang?

In *Hydra* scheinen jedenfalls Drüsenzellen und neuronale Zelllinien aus einer gemeinsamen Zelllinie hervorzugehen, den interstitiellen Stammzellen. Darüber hinaus führt einer der beiden neuronalen I-Differenzierungswege zu Zellen mit den kompliziertesten Sekretionsprodukten im Tierreich, den Nematocyten. In diesem Zusammenhang mag interessant sein, dass das Vertebraten-Homolog von LiAS, Mash 3 in Verbindung mit der Differenzierung von Speicheldrüsen beschrieben ist (Yoshida *et al.*, 2001). Die nähere Charakterisierung von LiAS selbst eröffnete eine Vielzahl von hochinteressanten Fragen und Diskussionspunkten: (i) Ist LiAS ein weiterer Transkriptionsfaktor mit dualer Funktion? Wenn ja, welcher? Wie wird LiAS reguliert? Was reguliert LiAS? In welchem Zusammenhang steht LiAS zu den Nematocytenfilamenten von Wood & Novak und zum NBM? (ii) Welche Bedeutung hat die Interaktion zwischen LiAS und der cytoplasmatischen Cadherin-Domäne? Besteht die Funktion in einer Regulation von LiAS? Wird LiAS durch die Interaktion daran gehindert Heterodimere zu bilden und als Transkriptionsaktivator zu wirken? Oder übt LiAS durch die Interaktion Einfluss auf andere Signalwege und Zell-Zellverbindungen aus? (iii) Sind Cadherine an der Migration von Nematocyten beteiligt? Besteht ein Zusammenhang zwischen Cadherin RIP durch den Presenilin 1-/Nicastrin-Komplex und der Entwicklung von Nematocyten-Nestern?

Es zeigt sich, dass bereits die Untersuchung eines von sechs neuen bHLH-Homologen in der Lage ist verschiedenste Gebiete der Zellbiologie miteinander zu verknüpfen. Welche Querverbindungen sich aus der Charakterisierung der übrigen bHLH-Homologe und speziell der ARP-Vertreter ergeben könnte, kann an dieser Stelle schwer abgeschätzt werden. Es scheint wahrscheinlich, dass einige dieser Homologe im NvDP aktiv sind und möglicherweise könnte sich eine Verbindung zu Drüsenzellen ergeben. Weiter Fragen stellen sich nach potentiellen ARP-Interaktionspartnern und Regulationsmechanismen.

Diese Fragen sind nur Teilaspekte eines Fragekomplexes, die in Zusammenhang mit bHLH-Proteinen auftreten. Eng mit diesem Komplex verknüpft ist auch die bislang kaum diskutierte Verbindung von bHLH- und Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Quan *et al.*, 2004). Nach einer von Quan und Kollegen aufgestellten Hypothese ist zur Differenzierung einer Zelle durch bHLH Faktoren die Kombination mit bestimmten Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren entscheidend. Wie bereits weiter oben erwähnt verfügt *Hydra* über eine beachtliche Menge von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren die Dr. Ulrich Technau als Nebenprodukt eines Genbank-Screens isolieren konnte (Technau, unveröffentlicht). Eine Reihe dieser Zinkfinger-Gene sind zudem in verschiedenen I-Zell-Populationen exprimiert (Lindgens *et al.*, 2004) und könnten zusammen mit bHLH-Proteinen die Entwicklung von I-Zellen steuern.

Aus den bisher angeschnittenen Themen und Fragen zeigt sich das ungeheure Potential des I-Zellsystems in *Hydra* und das Potential des Modellorganismus selbst. Die methodischen Fortschritte der letzten Jahre (Galliot *et al.*, 2007; Steele, 2006; Wittlieb *et al.*, 2006) einen kleinen Quantensprung innerhalb der Cnidarier-Forschung dar stellen. Es scheint nur noch eine Frage der Zeit, bis funktionelle Studien in *Hydra* zur Routine werden und in dieser Arbeit offengebliebene Fragen durch die Anwendung neuer Methoden beantwortet werden können. Darüber hinaus machen EST- und Genomprojekte Cnidarier zugänglich für systembiologische Ansätze und „Cross-Species“ Vergleiche, die wiederum Fragen nach der Evolution von molekularen Mechanismen und Einzelkomponenten dieser Mechanismen beantworten können und die Vernetzung zwischen bHLH-Faktoren und andere Genfamilien weiter aufklären könnten.

Cnidarier im allgemeinen und *Hydra* im Besonderen sind auf dem besten Wege eine Renaissance als Modellsysteme zu erleben. Dabei spielen nicht nur Entwicklungsbiologie, Evolution und Grundlagenforschung eine Rolle, sondern Cnidarier gewinnen mehr und mehr auch ökologische und ökonomische Bedeutung: Cnidarier sind eine Hauptkomponente des Zooplanktons und damit an der Basis einer der wichtigsten Nahrungsketten. Beispielsweise wirkt sich bereits heute die Zunahme von Medusen drastisch auf den Bestand der Fischbrut in Nord- und Ostsee aus was nicht nur Auswirkungen auf das Ökosystem sondern auch auf die Fischereierträge hat. Gleichzeitig sind Anthozoen Riff-Konstrukteure und errichten nicht nur für den Küstenschutz wichtige Barrieren sondern bilden auch die Kindergärten und Lebensräume zahlreicher Fischarten. Für ein besseres Verständnis der Cnidarier ebenso wie für anwendungsorientierte Aspekte, ist Grundlagenforschung von essentieller Bedeutung. Wie in dieser Arbeit gezeigt können sich dadurch zusätzlich Erkenntnisse im Bezug auf die Evolution von molekularen Mechanismen ergeben und verschiedene biologische Fragestellungen miteinander verknüpft werden. Jede dieser Fragestellung verfügt über eine Anzahl verschiedener Aspekte und eigene Querverbindungen, die in ihrer Gesamtheit ein recht komplexes Bild des „einfachen“ Organismus *Hydra* zeichnen.

Material & Methoden

1. Organismen

1.1. Versuchstiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit Hydrozoa der Spezies *Hydra vulgaris*, Basel und *Hydra magnipapillata* (105) durchgeführt. Hydren wurden in Massenkulturschalen unter Standardbedingungen bei 18°C in Hydramedium (HM) bzw. artifiziellem Meerwasser kultiviert und regelmäßig mit *Artemia salina* Nauplius-Larven gefüttert (Loomis, 1953; Lenhoff & Brown, 1970; Fujisawa & David, 1981)

1.2. Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293, EBNA; Invitrogen) wurden zur Expression rekombinanten Proteins für je vier bis sechs Passagen unter Standardbedingungen kultiviert (37°C; 80% Luftfeuchte, 5% CO₂). Stabil rekombinante Klone wurden in Puromycin-haltigem Selektionsmedium (siehe Abschnitt 2, S. 2 und Anhang) selektioniert, anschließend in Kryoröhrchen überführt und mit 5% (v/v) DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

1.3. Hefen

Für den Hefe „Two-Hybrid Screen“ (THS) wurde der Hefestamm YRG-2 (MATa, *ura3* 3-35, *his3*-200, *ade2*-10, *lys2*-801, *trp1*-901, *leu2*-3, *gal4*-542, *gal80*-538, *LYS::UAS_{GAL1}-TATA_{GAL1}HIS3*, *URA3::UAS_{GAL4-17mer(3x)}TATA_{Cycl}lacZ*) als ein Bestandteil des „GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vektor Kits“ (Stratagene) verwendet. Dieser Hefestamm ist Uracil (U) autotroph und auxotroph gegenüber Tryptophan (W), Leucin (L) und Histidin (H). Angelegte Kulturen wurden bei 30°C auf entsprechenden Medien inkubiert (siehe Tab. M1, S. 10). Stammpplatten (YRG2 untransfiziert, Köder- und Kontroll-Hefen) wurden nach 3-4 Tagen Inkubation bei 30°C auf 4°C überführt und in regelmäßigen Abständen (etwa 3-4 Wochen) auf neue Medien übertragen.

1.4. Bakterien

Für Konvertierung und Amplifikation der cDNA Bank im Rahmen des THS wurden die Stämme *XL1-blue* (MRF⁺ Δ(*mcrA*) 183 Δ(*mcrCB*-*hsdfSMR*-*mrr*) 173 *endA1* sup *E44 thi-1 recA1*, *gyrA96*, *relA1* *lac[F' pro AB lac1qZ ΔM15 Tn10(Tetr)]* und *XL0LR* (Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB*-*hsdfSMR*-*mrr*)173 *endA1*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA1*, *lac[F' proAB lac1qZ ΔM15 Tn10 (Tetr)]* su (non-suppressing), λr (λ resistant)) des „GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vektor Kit“ (Stratagene) verwendet. Falls nicht anders angegeben wurden alle Klonierungen ebenfalls mit *XL1-blue* (Stratagene) Zellen durchgeführt. Rekombinante Proteinexpression in Bakterien wurde mit dem Stamm *BL21DE3* durchgeführt (siehe rekombinante Proteinexpression).

2. Lösungen, Reagenzien und Medien

2.1. Bakterien-, Hefe- und Zellkultur-Medien

Für Platten wurde in der Regel eine Agar-Agar Konzentration von 18 g/ l eingesetzt. LB-Ampicillin Agar (LB_{amp}) enthielt 100 mg/ l Ampicillin, LB-Chloramphenicol Agar (LB_{cam}) 34 mg/ l und LB-Tetracyclin Agar (LB_{tet}) enthielt eine Antibiotikakonzentration von 15 mg/ l. NZY-Agar wurde auf pH 7,5 eingestellt und enthielt pro Liter 5 g NaCl, 2 g MgSO₄*7 H₂O, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und für Platten 15 g Agar. NZY-Top-Agar enthielt zusätzlich 0,7% (w/v) Agarose.

Als Hefevollmedium wurde YPAD-Medium mit pH 5,8, bestehend aus 20 g/l Pepton (Difco), 10 g/l Hefeextrakt (Roth), 40 mg/l Adeninsulfat und 2% (w/v) Glucose verwendet. Hefeselektivmedien (SD-Medien) bestanden aus 6,7 g/l „Yeast nitrogen base w/o amino acids“ (Difco), 2% Glucose, und pro Liter je 100 ml der entsprechenden Aminosäure-Dropout-Lösung (siehe Anhang, Tab. A1). Für die verschiedenen Tests und Kontrollen des THS wurden SD - HWLU, SD - HWLU^{+3AT}, SD - WLU, SD - WU, SD - LU und SD - U eingesetzt.

Zellkulturmedien für HEK 293, EBNA Zellen bestanden im Falle von Vollmedium aus 1% fötalem Kälberserum (FBS) und 50.000 U/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Sterp) in 500 ml D-MEM (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*, Gibco). Selektionsmedium enthielt zusätzlich 5 µg/ml Puromycin. Expressionsmedium entsprach Vollmedium ohne FBS. Alle Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2. Lösungen und Reagenzien

Für Hefetransformationen wurden 1 M und 0,1 M Lithium Acetat (LiAc), 50 % (w/v) PEG 3350 sowie Lachssperma DNA (Sigma) verwendet (siehe Abschnitt 3.4., S. 8 ff). Für β -Galactosidase „Filter-Lifts“ wurden jeweils 2 ml XZ-Mix pro Filter eingesetzt. Dazu wurde eine X-Gal Stammlösung von 20 mg/ml in DMF (N,N-Dimethylformamid) und eine Z-Puffer Stammlösung (pH 7) bestehend aus 16,1 g/l Na₂HPO₄ * 7 H₂O, 0,75 g KCl und 0,246 g MgSO₄ * 7 H₂O hergestellt. Der XZ-Mix wurde jeweils frisch angesetzt oder maximal eine Woche bei 4°C im Dunkeln gelagert. 100 ml bestanden aus 98 ml Z-Puffer, 0,27 ml β -Mercaptoethanol und 1,67 ml X-Gal Stammlösung.

Zur Plasmidisolation aus Hefe wurde ein Lysispuffer (YLP) aus 2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8) und 1 mM EDTA hergestellt (siehe Anhang). Alle Lösungen wurden mit sterilem MilliQ Wasser angesetzt. Sonstige Lösungen und Reagenzien wurden den jeweiligen Kits entnommen und Standard-Lösungen und Puffer nach gängigen Protokollen hergestellt (vgl. Anhang). Lösungen für RNA-*in situ* Hybridisierungen (ISH) wurden falls nicht anders beschrieben mit DEPC behandelt oder mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

Als Blocking-Reagenz wurde in Western Blots auf Nitrocellulose-Membranen PBS/ 0,3% Tween verwendet, bei Western Blots auf PVDF-Membranen 4% Milchpulver in PBS/ 0,1% Tween. Für Blocking-Schritte im Rahmen des *Hydra* ISH-Protokolls wurde 1% Ziegenserum (Ngs) in PBS/ 0,1% Tween und für *whole mount* Immunfärbungen 5% Ngs. Je nach Antikörper wurde die Blockierungslösung zusätzlich mit BSA und Tween versetzt (siehe Immunfärbung, S. 26 ff). Hier nicht aufgeführte Lösungen werden in Zusammenhang mit der entsprechenden Methode beschrieben.

3. Hefe- Two-Hybrid Screen“ (THS)

Die verwendeten Komponenten des Hefe-THS (Abb. M1) stammten aus dem „*GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vektor Kit*“ der Firma Stratagene. Falls nicht anders angegeben wurden die verwendeten Lösungen und Medien entsprechend des Benutzerhandbuches hergestellt und eingesetzt (siehe Anhang) und Standardprozeduren wie Phenol/Chloroform DNA Extraktionen und DNA-Ethanol-Fällungen nach gängigen Protokollen (Mülhardt, 2000; Sambrook *et al.*, 2001) durchgeführt.

3.1. verwendete cDNA-Bibliothek SAIL

Die Firma *Stratagene* erstellte für den Hefe THS eine kundenspezifische oligo-dT geprimte cDNA-Bibliothek (SAIL) aus *Hydra vulgaris* (Hobmayer *et al.*, 2000). Hierzu wurden *Hydra* cDNA-Fragmente mit den Restriktionsstellen *EcoRI* (5') und *XhoI* (3') in den *pAD-GAL4* Zielvektor kloniert und bildeten so Fusionshybride mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD). Die SAIL-Bibliothek lag zu Beginn der Arbeit amplifiziert und subkloniert im *HybriZAP2.1* Phagemidvektor vor (weitere Daten siehe Anhang). Der unamplifizierte Titer dieser Bibliothek betrug 10⁶ pfu/ml und der Fragmentgrößenbereich betrug nach Herstellerangaben 0,4 bis 2,8 kb.

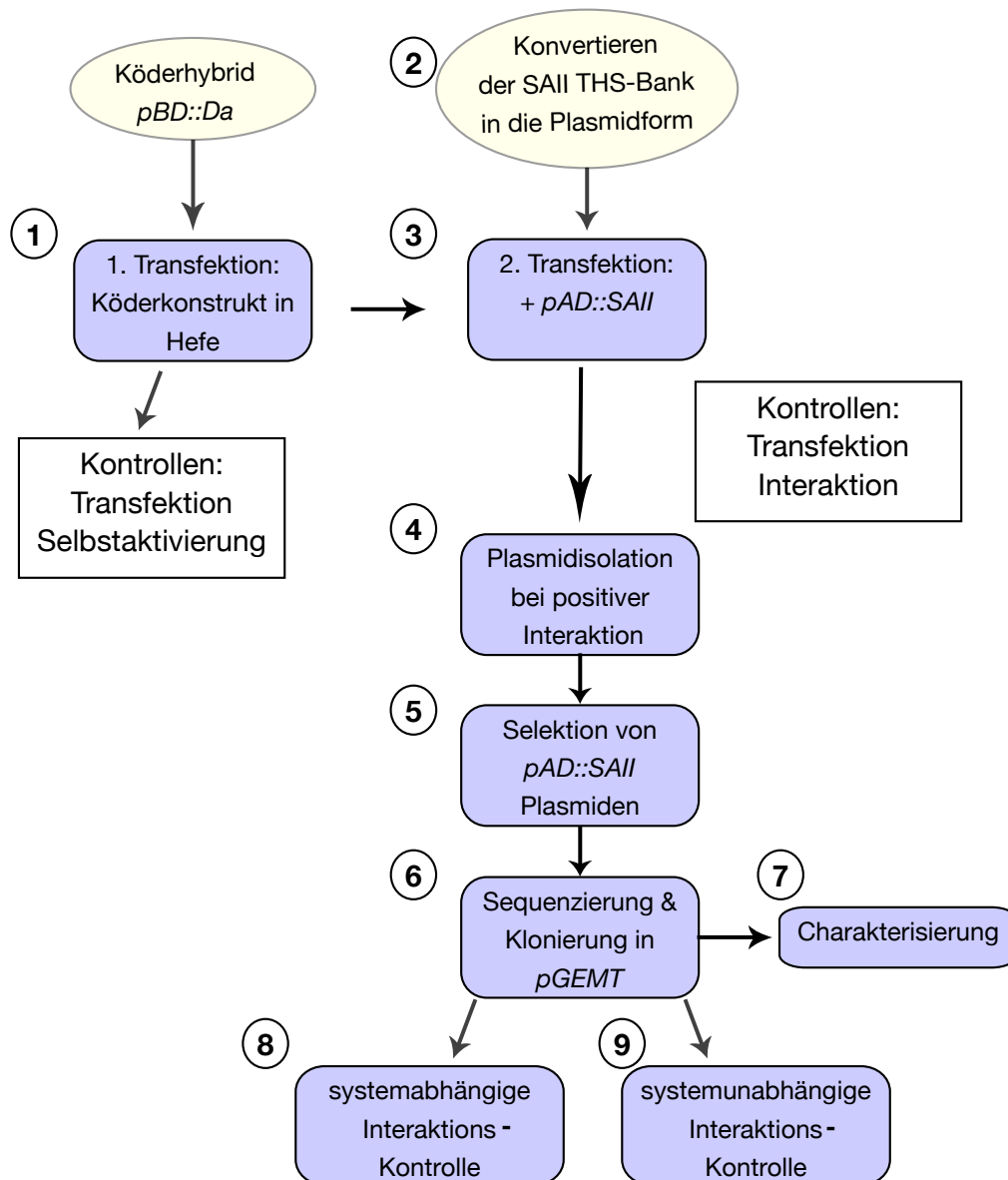


Abb. M1: Fließschema des “Two Hybrid Screen“ (THS)

Die Übersicht zeigt alle Arbeitsschritte des THS von (1) bis (9) schematisch zusammengefasst. (1) Nach Überprüfung der Hefen auf SD -U erfolgt die Transfektion mit dem Köderkonstrukt, gefolgt von Wachstumskontrollen auf SD -WU (Transfektionskontrolle) und SD -HWLU (erste Selbstaktivierungskontrolle). Zusätzlich wurde eine unspezifische Interaktion der Köder-Hefen mit dem pAD-Leer Vektor (ohne Hydra SAIL- Insert) ausgeschlossen (zweite Selbstaktivierungskontrolle). (2) Parallel wurde die Hydra cDNA - THS- Bank (SAIL) von der vorliegenden Phagemid- in die Plasmidform konvertiert und nach Abschluß der Selbstaktivierungskontrollen (3) in Köderhefentransfiziert. (4) Doppeltransfizierte Hefen wurden auf SD -WLU (Transfektionskontrolle) und SD -HWLU (Interaktionskontrolle) inkubiert. Bei Interaktion waren Hefen in der Lage auf SD -HWLU zu wachsen und wurden im Filter-Lift blau. Aus den entsprechenden Klonen wurden die Plasmide durch klassische Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung isoliert und (5) pAD::SAIL-Plasmide nach Transformation in XL1-blue-Bakterien auf LB_{amp} selektioniert. Nach Überprüfung der isolierten Konstrukte durch analytische Restriktion wurden die isolierten Plasmide sequenziert und für die weitere Charakterisierung in pGEMT kloniert. Parallel zur Charakterisierung durch ISH wurde im Falle des LiAS-THS die Interaktion (8) in Hefe bestätigt (systemabhängig) und ebenfalls biochemisch (9) überprüft (systemunabhängig). (Details siehe Text)

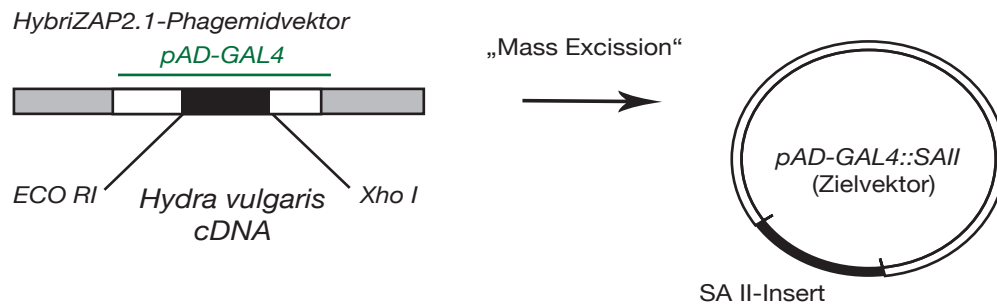


Abb. M2: Konvertierung der subklonierten *Hydra vulgaris* cDNA-Bibliothek in die Plasmidform

Zu Beginn lag die *Hydra vulgaris* cDNA-Bibliothek (SA II, orange) subkloniert im HybriZAP2.1 Phagemidvektor (grau) vor. Durch „Mass Excission“ wurde der subklonierte pAD-GAL4 Vektor ausgeschnitten und in die zirkuläre Plasmidform überführt. (Details siehe Text)

3.2. Konvertierung der *Hydra vulgaris* cDNA-Bibliothek SAII

Um die *Hydra vulgaris* cDNA-Bibliothek SAII im THS einsetzen zu können, musste sie von der linearen Phagemidform in die zirkuläre Plasmidform konvertiert werden („Mass Excission“, Abb. M2). Hierfür gab der Hersteller ein optimales Verhältnis von cDNA-Bibliotheks-Titer zu Bakterien zu Helferphagen von 1:10:100 an. Zum Berechnen der notwendigen Konzentrationen und Mengen, wurden zunächst die Titer von SAII und dem Helferphagen (ExAss) bestimmt.

3.2.1. Titerbestimmung von SAII-Phagen und Helferphagen

Hierfür wurden *XL1-blue* Bakterien bis zu einer optische Dichte (OD_{600}) von 0,5 bis 0,7 kultiviert, und durch 15 min Zentrifugation bei 500 xg (4°C, Ausschwingrotor) geerntet. Anschließend wurden die Bakterienpellets in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert, so dass sich eine OD_{600} von 1 ergab. Diese OD entsprach nach Herstellerangaben 8×10^8 Zellen/ml. Anschließend wurden jeweils 200 μ l *XL1blue* ($OD_{600}=1$) mit je 1 μ l verschiedener Verdünnungen von SAII und ExAss-Helferphagen infiziert und in 3 ml warmen Top-Agar auf NZY Platten über Nacht (ON) bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Anzahl (n) der Lysishöfe pro Platte bestimmt und der jeweilige Titer in „Plaque forming Units“ pro Milliliter (pfu/ml) errechnet ($[pfu/ml] = (n \cdot d \cdot 1000 \mu l/ml) / V$). Mit n= der Anzahl von Lysishöfen pro Platte, d= Verdünnungsfaktor der eingesetzten Phagemide (SAII) bzw. Phagen (ExAss) und V = ausplattierte Volumen pro Platte in μ l).

3.2.2. *in vivo* „Mass Excission“ und Zirkularisierung von pAD::SAII

Für die folgende *in vivo* „Mass Excission“ des Zielplasmids (pAD-GAL4 mit Hydra cDNA Insert) aus dem Phagemidvektor (HybriZAP2.1) wurden das 50- fache der unamplifizierten SAII-Bibliothek zu einem 500- fachen Überschuss an *XL1blue* Bakterien und 5000- fachen Überschuss an ExAss Helferphage entsprechend Herstellerempfehlungen eingesetzt. Dies entsprach einem Verhältnis von 5×10^8 pfu/ml cDNA Bibliothek zu 5×10^9 Bakterien zu 5×10^{10} pfu/ml Helferphagen. Analog zur Titerbestimmung wurden hierfür *XL1blue* Bakterien einer OD_{600} zwischen 0,3 und 0,4 geerntet und mit 10 mM $MgSO_4$ auf eine OD_{600} von ~ 5 resuspendiert ($\approx 4 \times 10^9$ Zellen/ml).

Anschließend wurden Bakterien und Phagen (SAII und ExAss) im obengenannten Verhältnis gemischt und stehend bei 37°C inkubiert. Nach 15 min Inkubation wurden die infizierten Bakterien 3 h in modifiziertem Luria Bertani (LB+) amplifiziert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Phagen durch einen 20 min Hitzeschritt bei 70°C. Bakterienbestandteile und Phagemide wurde durch 30 min Zentrifugation mit 500 xg (Ausschwingrotor) getrennt. Der isolierte Phagemidüberstand (ausgeschnittener, linearer pAD-GAL4 Vektor mit Hydra cDNA-Insert) wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C bis zu 4 Monaten gelagert. In diesem Zeitraum wurde der Phagemidüberstand wiederholt für die folgenden Schritte in *XLOLR* Bakterien verwendet.

Für die Zirkularisierung der ausgeschnittenen SAII-Bibliothek sollen nach Angaben des Herstellers *XLOLR* Bakterien und SA II- Phagemidüberstand in einem Verhältnis von 10: 1 inkubiert werden. Um die notwendige Phagemidmenge bestimmen zu können, wurde zunächst der Titer des SAII-Phagemidüberstandes als „colony forming unit“ pro Milliliter (cfu/ml) bestimmt. Dieser Wert ergab sich aus der Anzahl (n) infizierter *XLOLR* Bakterien auf LB_{amp} pro Platte multipliziert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (d) und Umrechnungsfaktor, geteilt durch das Volumen (V) der eingesetzten Phagemidverdünnung in μl ($[cfu/ml] = (n \cdot d \cdot 1000 \mu l/ml) : V$).

Nach Ermittlung des Phagemidtiters wurden *XLOLR* einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,7 geerntet, mit 10 mM $MgSO_4$ auf $OD_{600}=1$ resuspendiert und mit dem jeweils errechneten Volumen Phagemidüberstand (SAII) 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-Suspension in 0,5 l LB_{amp} überführt und bis zu einer OD_{600} zwischen 0,3 und 0,4 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Zellen 15 min bei 500 xg zentrifugiert und die erhaltenen Pellets entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder sofort weiter verarbeitet. Die zirkularisierten SAII-Plasmide wurden nach Prinzip der alkalischen Detergenzlyse mit handelsüblichen Plasmid-Midipräparations Kits isoliert in 500 μl 5 mM Tris Puffer (pH 7,5) aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.3. Köderplasmide und Kontrollplasmide

Im Fall des Daughterless (Da)-THS wurde das Köderkonstrukt *pBD-Da* von Katja Seipel und Volker Schmid (Müller *et al.*, 2003) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um ein Hybrid der GAL4 DNA-Bindedomäne (BD) mit dem konservierten bHLH-Bereich von *Drosophila* Daughterless (Aminosäure 547- 614) im *pBD-GAL4 Two Hybrid* Vektor (Stratagene). Im Falle des Hydra-Like Achaete/Scute (hyLiAS)-THS wurde das Köderkonstrukt im Rahmen der Diplomarbeit von Nadja Bednorz (2004), ausgehend von einem hyLiAS Vollängenkonstrukt (*pGEMT::hyLiAS*) kloniert. Das entsprechende Köderkonstrukt umfasste das konservierte basic Helix-Loop-Helix (bHLH)-Motiv und wurde mit den Primern 5'*LiASbHLH* (cca**GAATTC**ATTCGCAAAAGAAAT) und 3'*LiASbHLH* (acc**CTGCAG**TTAGTAGT TAATGGC), einschließlich der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* (5'), *PstI* (3') und Stopp-Codon mittels „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) amplifiziert und gerichtet in den *pBD-GAL4* Ködervektor (Stratagene) kloniert. Das resultierende Konstrukt *pBD-LiASbHLH* bestand aus der GAL4- DNA Bindedomäne fusioniert mit der bHLH-Domäne von HyLiAS.

Als Kontrollplasmide wurden das im „HybriZAP 2.1. Two Hybrid-Kit“ enthaltende *pGAL4* Plasmid sowie die beiden interagierenden Konstrukte *pAD-HyCad* (*Hydra Cadherin*) und *pBD-HyCat* (*Hydra Catenin*) (Hobmayer *et al.*, 2000) eingesetzt. Eine erfolgreiche Transfektion mit *pGAL4* sowie Konstrukte im *pAD-GAL4* Vektor ermöglichte YRG2-Hefen das Wachstum in Abwesenheit von Leucin (L), während Konstrukte im Ködervektor *pBD-GAL4* ein Wachstum auf Tryptophan (W) freien Medien ermöglichten (siehe Tab. M1, S).

3.4. Hefetransfektion

Zu Beginn des THS wurde der YRG2-Hefestamm Autotrophie gegenüber Uracil (U) und auf Auxotrophie gegenüber Leucin (L), Tryptophan (W), und Histidin (H) überprüft. Hierfür wurden Gritplatten auf entsprechenden Mangelmedien angelegt. Positiv getestete Hefen (kein Wachstum auf: SD-LU, SD-WU-SD-WLU und SD- HWLU) wurden für die folgenden Transfektionen eingesetzt. Gleichzeitig diente dieser Test als Qualitätskontrolle der verwendeten Mangelmedien.

Abweichend vom *Stratagene „HybriZAP-2.1“* THS Handbuch, richteten sich alle Hefetransfektionen nach Protokollen des Gietz -Labors (Schiestl & Gietz, 1989; Gietz *et al.*, 1992; Gietz & Wood, 2006; Gietz & Wood, 2007). Bei diesen Protokollen wurde in „Quick & Easy“ (Lithiumacetat/ Einzelstrang „Carriere DNA“/Polyethylenglycol-Methode; Gietz *et al.* 1997) und „High-Efficiency“ (Gietz & Woods, 2002) Transfektionen unterschieden. Alle Kontrollplasmide und Köderkonstrukte wurden gemäß „Quick & Easy“ Protokoll (Abb. M3) transfiziert. Transfektionen im Rahmen des Screens wurden gemäß „High Efficiency“ Protokoll durchgeführt.

3.4.1. Quick& Easy“ Hefetransfektion

Für vier Transfektionen wurden 125 µl YRG-2 Hefen von entsprechenden SD-Platten entnommen und in 1 ml sterilem MilliQ Wasser resuspendiert. Die Hefen wurden kurz sedimentiert (5 s Tischzentrifuge) und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml 0,1 M Lithumacetat (LiAc) aufgenommen und 5 min schüttelnd bei 30°C inkubiert. Von den nun kompetenten Hefen wurden jeweils 200 µl pro Transfektion in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (5 s, Tischzentrifuge) wurde der Überstand vollständig abgenommen und nacheinander 240 µl PEG (50%, MW 3350), 36 µl 1 M LiAc, 10 µl denaturiertes Lachssperma (10 µg/ µl, Promega), 5 µl Plasmid (100 ng -5 µg) und 69 µl steriles MilliQ Wasser auf die Hefen gegeben. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl Reihenfolge als auch Volumina des Transfektionsmix kritisch sind.

Die Mischung wurde gründlich gemixt und 20 min bei 42°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation für 8 s wurde der Überstand entfernt und die Hefen in 200 µl sterilem MilliQ Wasser schonend resuspendiert. Gemäß Erfahrungswerten waren so transfizierte Hefen anfällig für mechanischen Stress. Daher wurden sie mit maximal 3 Zügen auf entsprechenden SD Mangelmedium Platten ausgestrichen und die noch feuchten Platten bei 30° C für 3 Tage in einer Feuchten-Kammer aufrecht stehend inkubiert. (Fließschema siehe Abb. M3)

3.4.2. “High Efficiency“ Hefetransfektion

Eine Startkultur YRG-2-Hefen wurden ON bei 30°C in 20 ml entsprechendem Selektionsmedium kultiviert. Anschließend wurde die Zellzahl der Kultur mit einer Bürkerkammer bestimmt. In 50 ml YPAD Vollmedium wurde mit entsprechend viel Volumen Startkultur eine Endzelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Diese Kultur wurde weiter bis zu einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml inkubiert (etwa 3 bis 5 h) und anschließend geerntet (5 min, 1300 rpm Ausschwingrotor).

Das erhaltene Pellet wurde in 25 ml sterilem Wasser gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,1 M LiAc in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut kurz zentrifugiert (15 s Tischzentrifuge, max. Geschwindigkeit). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 0,1 M LiAc in einem Endvolumen von 500 µl aufgenommen und resuspendiert. Für Transfektionen wurden diese 500 µl à 50 µl aliquotiert. Pro Ansatz wurden in folgender Reihenfolge zu 50 µl Hefen 240 µl PEG (50%, MW 3350), 36 µl 1 M LiAc, 10 µl denaturiertes Lachssperma (10 µg/ µl), 50 µl cDNA- Bibliothek SAIL (1 µg- 5 µg) und 24 µl steriles MilliQ Wasser gegeben. Die Mischung wurde bis zur vollständigen Resuspension des Pellets gevortext und anschließend 30 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in Aliquots von 200 µl auf entsprechenden Mangelmedien (vgl. Tab. M1, S. 10) schonend ausgestrichen (in möglichst wenig Züge, max. 3) und die Platten aufrecht bei 30°C für mehrere Tage inkubiert.

Erfolgreiche Transfektionen mit dem Köderplasmid *pBD-GAL4* ermöglichte den Uracil (U) autotrophen YRG2-Hefen zusätzliches Wachstum (vgl. Tab M1, S.) auf Tryptophan (W) freiem Selektivmedium (SD -WU). Transfektion mit dem Zielvektor *pAD-GAL4* erlaubte YRG2 Hefen ein Wachstum auf Leucin (L) freiem Medium (SD-LU). Bei positiver Interaktion von Köder- und Zielhybrid wurde das HIS Reportersystem aktiviert und ermöglichte Wachstum (vgl. Tab.1) auf Histidin-freiem Medium (SD-HWLU) (vgl. Tab. M1, S.).

3.5. Selbstaktivierungskontrollen von Köder- und Zielkonstrukten

Alle Köderplasmide wurden vor ihrem Einsatz im Hefe-THS auf Selbstaktivierung (d.h. auf unspezifische Aktivierung der Reportersysteme) getestet. Hierfür wurden erfolgreich mit Köderkonstrukten transfizierte Hefen (Köderhefen) mit dem Vektor *pAD-GAL4* ohne Insert (*pAD-leer*) transfiziert. Nur wenn diese doppelt transfizierten Hefen kein Wachstum auf SD -LU, SD -WLU und SD-HWLU zeigten (vgl. Tab. M1, S. 10), wurden die entsprechenden Köderkonstrukte verwendet.

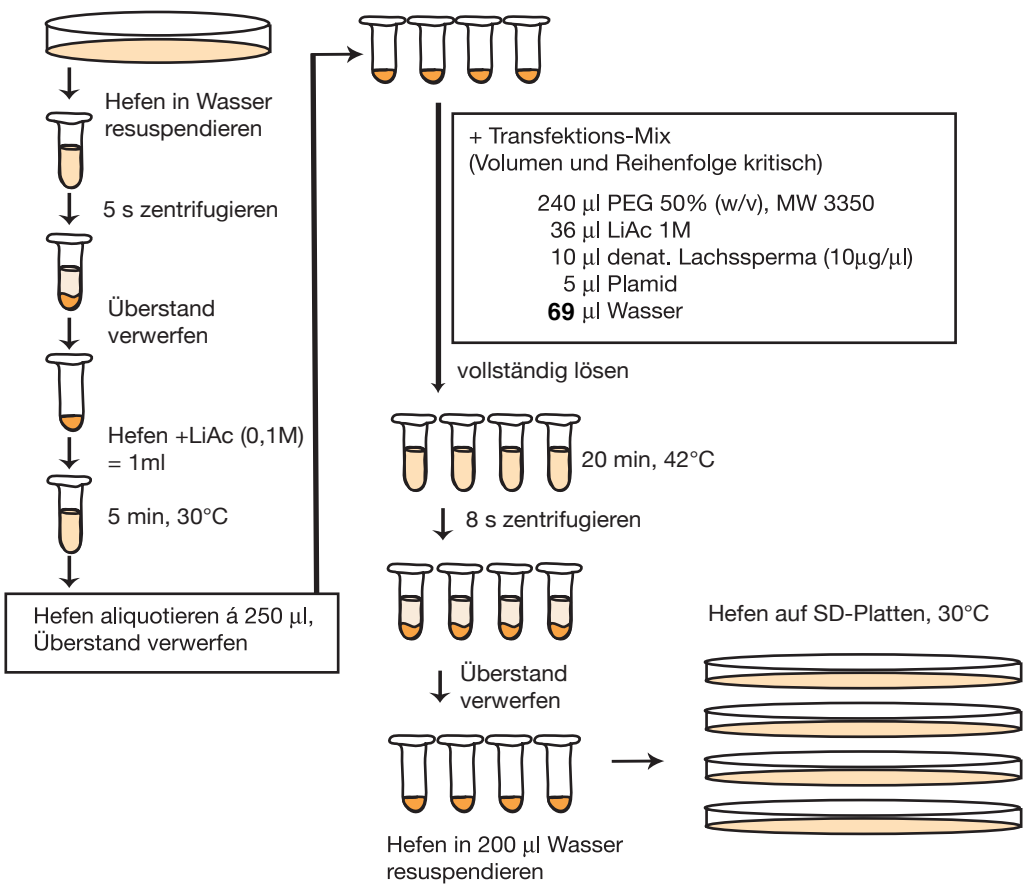


Abb.M3: Fließschema der Quick&Easy™-Transfektion nach Gietz (1997)

Erklärung siehe Text Seite 99, Abschnitt 3.4.1

Plasmid	SD -U	SD -WU	SD -LU	SD -WLU	SD -HWLU
---	+	-	-	-	-
pBDGAL4	+	+	-	-	-
pADGAL4	+	-	+	-	-
pBD::Da	+	+	-	-	-
pAD::SAII	+	-	+	-	-
pBD::Da+ pAD::SAII	+	+	+	+	+/-
pBD::Da+ pADGAL4	+	+	+	+	-

PGAL4	+	-	+	-	-
pBD::Cat+ pAD::Cad	+	+	+	+	+

Tab. M1 : Verhalten von YRG 2 Hefen auf Selektivmedien (SD)

Die Tabelle zeigt das Wachstum von YRG 2 Hefen vor und nach Transfektion auf verschiedenen Selektivmedien (SD). Der untransfizierte YRG 2 Hefestamm ist Uracil (U) autotroph und benötigt die Anwesenheit von Leucin (L), Tryptophan (W) und Histidin (H). Durch die Transfektion mit entsprechenden Konstrukten wird den Hefen Wachstum auf verschiedenen Mangelmedien ermöglicht: *pBD*- Konstrukte erlauben Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan, *pAD*- Konstrukte Wachstum ohne Leucin (L). Interagieren die Konstrukte werden die Reportersystem Histidin und β -Galactosidase und aktiviert, was durch Wachstumskontrollen und Blaufärbung nachzuweisen ist (siehe Text). Die Kontrollplasmide *pGAL4*, *pBD::Cat* und *pAD::Cad* dienen als positiv Kontrollen beider Reportersysteme (siehe Text)

Analog wurden putative Interaktionspartner (isolierte *pAD*-Konstrukte, nach positiver Interaktion mit Köderkonstrukt) im LiAS-THS mit leerem *pBD-GAL4* Vektor getestet. Hierfür wurden die entsprechenden *pAD-GAL4* Konstrukte isoliert und in *YRG2*-Hefen mit *pBD-GAL4* Vektor ohne Insert (*pBD-leer*) transfiziert. Wurden auch in diesem Fall beide Reportersysteme aktiviert, waren die isolierten *pAD*-Konstrukte selbstaktivierend und die entsprechenden Klone wurden als falsch-positiv gewertet.

3.6. Selektion und Überprüfung möglicher Interaktionspartner

Da *YRG2* Hefen auxotroph für Leucin (L), Tryptophan (W) und Histidin (H) waren, konnte der Erfolg einer Transformation direkt durch Wachstum auf den entsprechenden Mangelmedien (SD- WU, SD-LU, SD-WLU) nachgewiesen werden (vgl. Tab. M1, S. 10). Gleichzeitig ermöglichte eine Interaktion von Köder- und Zielhybriden das Wachstum auf Histidin freiem Medium (SD-HWLU). Um falsch-positive Reaktionen durch die bekannte Hintergrundaktivität des HIS-Promotors zu unterdrücken, wurde dem Selektionsmedium SD-HWLU zusätzlich 10-5 mM 3-Aminotriazol (3-AT) (Roth) hinzugefügt. Hefen die in Gegenwart von 3-AT auf SD-HWLU Medium wachsen konnten wurden ON in flüssigem SD-HWLU bei 30°C inkubiert und anschließend als Heferasen auf SD-Agar Platten (SD-HWLU+3AT) kultiviert. Parallel wurden positive Klone auf Grit-Platten überimpft und im „Filter-Lift“ auf die Aktivierung des zweiten Reportersystems (GAL4) überprüft.

Für den β -Galactosidase-„Filter-Lift“ wurden die zu testenden Hefen auf Protran BA 85 Membranen (Schleicher & Schüll) immobilisiert. Parallel dazu wurden Whatman Filter (Grad 1; 8,5 cm) mit 2 ml XZ-Mix (siehe S. 3) in einer Petrischale getränkt. Die immobilisierten Hefen wurden durch mehrfaches Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen aufgeschlossen und anschließend mit der Kolonieseite nach oben auf die getränkten Whatman Filter gelegt. Die entsprechenden Petrischalen wurden mit Parafilm versiegelt und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei Aktivierung des zweiten Reportersystems trat eine Blau-Färbung spätestens nach 24-30 h ein.

4. Charakterisierung von positiven Hefe-THS Interaktionspartnern

4.1. Plasmidisolierung aus Hefe, Amplifikation und Sequenzierung

Hefeklone, die für beide Reportersysteme positiv getestet wurden (Wachstum auf SD - HWLU und Blaufärbung im „Filter-Lift“), wurden in je 5 ml SD - HWLU ON bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Hefen in einer Tischzentrifuge pelletiert, die Pellets in 200 μ l „Yeast Lysis Buffer“ (YLB) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach wiederholtem Schockfrieren und Auftauen (4- 6mal) wurde zu den aufgeschlossenen Hefen 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Rotiphenol; Roth) gegeben. Proteine und Nukleinsäuren wurden durch mehrfaches Ausschütteln in Rotiphenol (Roth) getrennt und Nukleinsäuren mit Ethanol und Natriumacetat (NaAc) präzipitiert. Dazu wurde zur wässrigen Phase 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5) und das 2,5 fache Volumen Ethanol gegeben. Nach 10 min Zentrifugation (Tischzentrifuge; max. Geschwindigkeit) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde das Pellet in 25 μ l sterilem Wasser aufgenommen.

Zur Selektion der *pAD*-Konstrukte wurden *XL1blue*-Bakterien mit 2 bis 5 μ l isolierter Hefepiasmid- Lösung elektroporiert und auf LB_{amp} Platten ON bei 37°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation mit *pAD*-Konstrukten war ein Wachstum auf ampicillinhaltigem Medium möglich. Nach einem Vermehrungsschritt in Flüssigkultur (LB_{amp}, ON, 37°C) wurden die entsprechenden *pAD*-Konstrukte nach Prinzip der alkalischen Detergenzlyse mit handelsüblichen Kits isoliert und je nach Folgeschritten entweder in 50 μ l H₂O oder 5 mM Tris (pH 7) aufgenommen. Der Erfolg der Plasmidisolierung wurde durch Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *XhoI* (Amersham) und *EcoRI* (Amersham) überprüft.

4.2. „Rapid amplification of cDNA ends“ (RACE)

5' RACE Reaktionen wurden mit dem „GeneRacer-Kit“ (Invitrogen) durchgeführt. Zu Beginn wurde aus 30-60 ungefütterten Tieren cDNA hergestellt und als Matrize in verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:10, 1:5) eingesetzt. Pro Reaktion wurden 1 µl cDNA, 5 µl PCR-Puffer (Amersham), 36,5 µl H₂O, 0,5 µl dNTPs (jeweils 25 mM), 1 µl genspezifischer Primer (10 µM), 3 µl GeneRacer 5' Primer (10 µM) und 0,5 µl Taq- Polymerase (Amersham) eingesetzt. Dabei wurde orientierte sich die Wahl der genspezifischen Primer an der Schmelztemperatur der externen und internen 5' GeneRacer Primer (5' GeneRacer ext: GGTGTTCTCTGAACAACCTGGTTGATCGTAGTC, T_m ~68°C; 5' GeneRacer int.: GGCAGATACGACAAACCATTGCCGTCTGTG, T_m ~70°C). Mit oben beschriebenen Reaktionsansätzen wurden je Klon verschiedene Variationen von „Hot-Start/Touch-Down“ PCR durchgeführt. Dabei wurde Zyklenzahl und Temperaturgradient je nach Konstrukt angepasst. Im Falle von *HyLiAS* erfolgte die PCR unter folgenden Bedingungen: 1x 94°C, 2 min; 10x (94°C, 30 s; 65°C, 1 min); 10x (94°C, 30 s; 60°C, 1 min); 10x (94°C, 30 s; 55°C, 30 s); 30x (94°C, 30 s; 52°C, 1 min, 72°C, 1,5 min) und 1x 72°C, 7 min.

4.3. Ligation, Transformation und Plasmidpräparation

Falls nicht anders beschrieben, wurden Ligationen ON bei 4°C durchgeführt. Nach Berechnung von optimalem Insert-Vektorverhältnis wurden in 10 µl Reaktionsvolumen 1 µl T4 Ligase (Promega) und 5 µl Ligase Puffer (Promega) mit den entsprechenden Mengen Insert und Vektor gemischt. Standard TA-Klonierungen wurden mit dem *pGEMT*-Kit (Promega) durchgeführt. Für alle andere Klonierungen wurden Inserts entweder durch PCR mit spezifischen Primern erzeugt und anschließend enzymatisch gespalten oder aus zwischen-klonierten Konstrukten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen isoliert. Nach Aufreinigung der isolierten Produkte (Gelextraktion mit handelsüblichen Kits) wurde in den entsprechend enzymatisch hydrolysierten Zielvektor, unter Verwendung der *Promega* T4-Ligase und des T4-Ligase Puffers, ON bei 4°C ligiert.

In der Regel wurden Transformationen mit chemokompetenten Bakterien durchgeführt. Dazu wurden gemäß Hitzeschock-Protokoll 50-100 µl chemokompetente Zellen 30 min mit 10 µl Ligationsansatz auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 45 s Hitzeschock bei 42°C und 2 min Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl SOB oder LB Medium wurden die Zellen 1 h bei 37°C geschüttelt, kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge, max. Geschwindigkeit) und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde im Restvolumen resuspendiert, auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und ON bei 37°C inkubiert. Im Falle von *pGEMT* Klonierungen erfolgte zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion auf LB-AXI-Platten. Positive (weiße) Klone wurde gepickt und in 2-4 ml flüssig Medium ON bei 37°C inkubiert. Die Konstrukte wurden mit handelsüblichen Kits nach Prinzip der alkalischen Detergenzlyse isoliert und für weitere Experimente in 50 µl 0,5 mM Tris bzw. in H₂O aufgenommen. Der Erfolg der Klonierungen wurde durch analytische Restriktionshydrolyse, PRC mit Vektor- oder genspezifischen Primern und Sequenzierung überprüft. Alle Transformationen mit isolierten Hefepiasmiden durch Elektroporation in elektrokompenten Bakterien durchgeführt.

4.4. Sequenzanalyse und Phylogenie

Zu sequenzierende Plasmide oder PCR-Produkte wurden entsprechend den Bestimmungen der Firma GATC vorbereitet und eingeschickt. Die Sequenzierung erfolgte entweder mit Standard-Primern (T7, SP6, T3) oder mit vektorspezifischen *pAD*- Primern.

Erhaltene Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit, Jellyfish, Geneious oder ClustalW analysiert und mit blastX (*basic local alignment tool*; Datenbanksuche in allen 6 Leserahmen) auf Homologien untersucht. Für Phylogenieanalysen der bHLH-Faktoren wurde anlehnen an Ledent *et al.* (2001, 2002) und Simionato *et al.* (2007) nur die konservierte bHLH-Domäne berücksichtigt. Stammbäume wurden mit dem „quarted- sampling Neighbor-Joining“ Algorithmus (NJ) mit Tree-Puzzle (Schmidt *et al.*, 2002) oder dem implementierten NJ Algorithmus des „Geneious“-Softwarepaketes rekonstruiert.

5. Expressionsanalyse

5.1. Whole mount“ RNA in situ Hybridisierung (ISH)

Gene von Interesse lagen zu Beginn kloniert in *pAD-GAL4* (Stratagene), *pGEMT* (Promega) oder *pBlueskript* (Stratagene) vor und wurden von T7 (*pAD-GAL4*), SP6/ T7 (*pGEMT*) bzw. T7/ T3 (*pBlueskript*) Promotoren flankiert. Die zur RNA SONDENSYNTHE notwendigen DNA- Matrizen wurden durch PCR mit Promotor- und genspezifischen- Primern, abhängig vom vorliegenden Vektor erzeugt und die Orientierung der Gene parallel mittels PCR mit 5' genspezifischen- Primern und Promotor- Primern überprüft. Die Lokalisation der Transkripten im Tier erfolgte mit einzelsträngigen, Digoxigenin- oder FITC- markierten RNA-Sonden

Ausgehend von aufgereinigten PCR-Produkten der jeweiligen Gene wurden Einzelstrang-RNA Soden mit dem „DIG/FITC RNA Labeling-Kit“ (Roche) hergestellt. Pro Sonde wurden hierfür in 20 µl gesamt Volumen 200-300 ng DNA template in H_2O_{DEPC} , 2 µl Dig- bzw. FITC-RNA markierter Nukleodidmix, 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl RNase Inhibitor und 2 µl RNA-Polymerase für 2-4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden nicht eingebaute Nucleotide mit *BioRad-Spin-Columns* (BioRad) aus den Proben entfernt. Dazu wurden die *Spin Columns* entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und die Proben in ca. 20 µl eluiert. Zur Kontrolle der SONDENSYNTHE und Aufreinigung wurden die Proben kurz bei 80°C denaturiert und je 1- 2 µl der RNA Proben auf 1% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Vergleichend mit einem markierten RNA-Größenstandard (Roche) wurde die Sondenkonzentration vom Agarosegel abgeschätzt und eine ungefähre Sondenkonzentration von 5 ng/µl mit Formamid (Fluka) eingestellt. Anschließend wurden die Sonden aliquotiert bei -80°C gelagert und optimale Verdünnungen in den folgenden Experimenten ausgetestet.

Alle ISH-Experimente wurden mit ungefütterten Tieren durchgeführt, die zunächst in 2% (w/v) Urethan in Hydramedium 1 min relaxiert und anschließend mit 4% (w/v) PFA in PBS ON bei 4°C fixiert wurden. Teilweise wurden fixierte Tiere in Methanol überführt und für Kontrollversuche bei - 20°C gelagert (nicht länger als 14 d). Zu Beginn der ISH wurden die fixierten Tiere 2x für 5 min bei RT in frischem Methanol inkubiert. Anschließend erfolgte eine schrittweise Rehydrierung mit PBS/0,1% (v/v) Tween (PBT) für jeweils 5 min bei RT (25% PBT/75% Methanol, 50% PBT/50% Methanol, 75% PBT/25% Methanol), gefolgt von 3 abschließenden Schritten in PBT für 5 min bei RT.

Um eine gute Zugänglichkeit der RNA-Sonden zu gewährleisten, erfolgte eine Proteinase K Behandlung (10 µg/ml in PBT, Sigma) der Tiere für 8- 10 min bei RT, die mit Glycin (4 mg/ml in PBT) gestoppt wurde (1x kurz, 1x 5 min RT). Nach 5 min Äquilibrierung in 0,1 M Triethanolamin (TEA) bei RT erfolgten für jeweils 5 min Inkubationsschritte in 1:400 und 1:200 verdünntem Essigsäureanhydrid in TEA. Danach wurden die Tiere 5 min in PBT gewaschen und 20 min in 4% PFA in PBT refixiert. Das Fixativ wurde in 5 Waschritten à 5 min mit PBT entfernt und die Tiere 10 min in 50% Hybridisierungslösung/50% PBT auf die Prähybridisierung vorbereitet. Nach einem weiteren Inkubationsschritt für 10 min bei RT in Hybridisierungslösung wurden die Tiere bei 55°C für mindestens 2 h prähybridisiert.

Im Anschluss wurde je Ansatz zu 100 µl Hybridisierungslösung verschiedene Mengen denaturierter (2 min 80°C, Eis) RNA-Sonde gegeben. Falls nicht anders beschrieben wurde standardmäßig 1 µl markierte Probe verwendet, was einer ~Endkonzentration von 0,05 ng/µl entsprach. Die Hybridisierung erfolgte abhängig von verwendeter Probe zwischen 54- 58°C für mindestens 24 h und höchstens 65 h. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die RNA-Sonde entfernt und die Tiere 5 min bei 55°C mit Hybridisierungslösung gewaschen. Es folgten 3 Inkubationsschritte für jeweils 5 min bei 55°C mit abnehmenden Hybridisierungslösung- und zunehmenden SSC-Anteil (75% Hyb./ 25% SSC; 50% Hyb./ 50% SSC; 25% Hyb./ 75% SSC). Anschließend wurden die Tiere 2x30 min in SSC/0,1% CHAPS bei 55°C gewaschen.

In Vorbereitung auf die Antikörperreaktion wurden die Tiere bei RT 10 min in MAB äquilibriert und anschließend für 2 h in MAB mit 1% NGS (*Natural Goat Serum*) blockiert. Für die Antikörperreaktion wurden α -Digoxigenin (α -Dig) bzw. α -FITC, jeweils gekoppelt mit Alkalische Phosphatase (Roche), 1:4000 in Blockierlösung (MAB/0,1% NGS) verdünnt und ON bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden anschließend durch 8x 30-60 min Waschschrte bei RT entfernt und die Tiere in 24-well Mikrotiterplatten überführt. Nach 4x5 min Äquilibrieren mit NTMT erfolgte die Substrat Reaktion mit 200- 300 μ l NBT/BCIP Lösung (Roche) 1:50 verdünnt in NTMT im Dunklen bei 37°C. Die Substratreaktion wurde in regelmäßigen Intervallen am Binokular überprüft und mit Ethanol gestoppt. Nach Rehydrierung in PBS wurden die Präparate in PBS/Glycerin (1:9) auf Objekträgern montiert und mikroskopisch ausgewertet.

5.2. Bromdesoxyuridin (BrdU) Markierung in Kombination mit ISH

Untersuchungen zum Zellzyklusstatus (proliferierend oder nicht-proliferierende Population) und zur Bestimmung der Differenzierungszeit wurden BrdU Puls- und Dauermarkierungsversuche durchgeführt und mit ISH-Experimenten kombiniert. Hierfür wurden Hydren in BrdU-haltigem Hydramedium unter Standardbedingungen kultiviert. Die BrdU Konzentration im Falle der Pulsmarkierung betrug 5 mM, im Falle der Dauermarkierung 1 mM.

Für Pulsmarkierungsexperimente wurden Tiere nach 30 und 60 min entnommen und wie beschrieben mit 2% (v/v) Urethan relaxiert und in 4% (w/v) PFA in PBS fixiert. Für die Dauermarkierung wurden Tiere nach 12 h, 24 h, 38 h, 48 h, 60 h, 72 h, und 84 h entnommen und ebenfalls wie oben beschrieben fixiert. Die anschließende ISH wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 5.1, S. 16). Sämtliche Inkubations- und Waschschrte wurden dabei im Dunkel durchgeführt. Nach Abstoppen der ISH- Substratreaktion mit Ethanol, wurden die Präparate 4x 5 min in PBS gewaschen und 30 min in 2 N HCl inkubiert, um die BrdU-haltige DNA für die anschließende Antikörperfärbung zugänglich zu machen. Anschließend wurden BrdU- markierte Kerne mit anti- BrdU-Antikörper (1:15 in PBS/0,1% (w/v) BSA) bei 4°C ON detektiert, 3x5 min mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben in PBS/ Glycerin eingebettet und montiert. Danach wurden die Präparate halbseitig ausgewertet und die Anzahl der ISH-positiven Signale, die gleichzeitig BrdU-positiv waren bestimmt und die Ergebnisse einzelner Zeitwerte prozentual miteinander verglichen.

6. Herstellen eines polyklonalen anti-LiAS Antikörpers

6.1. Klonierung rekombinanter LiAS Konstrukte

Für die rekombinante Proteinexpression in HEK 293, EBNA Zellen wurde mittels PCR und *Proofreading* Polymerase, ausgehend von einer sequenzierten *pGEMT::LiAS* Matrize mit den Primern 5'*LiASpCep-Pu* (5' *LiASpCep-Pu*: ccg**GCTAGC**cATG ACAAGCACATACAC) und 3'*LiASpCep-Pu* (3'*LiASpCep-Pu*: ggc**GGATCC**TTAATTTCTACGTCAATCAT) ein 523 bp Fragment erzeugt (100 μ l Ansatz: ~200 ng Matrize, jeweils 1 μ l Primer (20 pmol/ μ l), 0,5 μ l dNTP (jeweils 10 mM), 10 μ l Taq Puffer (Amersham), 0,5 μ l Tripelmaster Taq Polymerase (Eppendorf), 86 μ l H₂O; PCR Bedingungen: 1x95°C, 3 min; 25x (95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 1 min); 1x72°C; 1x4°C, ∞). Dabei wurden durch die gewählten Primer gleichzeitig Restriktionsschnittstellen (5' **NheI** und 3' **BamHI**), ein Stopp- Codon (3', kursiv) und 5' ein Linker von einem Nucleotid eingeführt, die eine gerichtete Klonierung, „*in frame*“ mit den Tags des Zielvektor *pCep- Pu- His/ Myc* ermöglichten.

Die amplifizierten Fragmente wurden mit dem „SV Gel& PCR Clean Up“- Kit (Promega) aufgereinigt, in H₂O aufgenommen und anschließend mit den Restriktionsenzymen *NheI* (Biozym) und *BamHI* (Biozym) 1 h bei 37°C hydrolytisch gespalten. Die Ligation in den ebenfalls mit *NheI* (Biozym) und *BamHI* (Biozym) gespaltenen *pCep-Pu-His/Myc* erfolgte ON bei 4°C mit T4 Ligase (Promega). Am nächsten Tag wurden mittels Hitzeschock-Protokoll chemokompetente *XL1blue*-Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert und positive Klone ON bei 37°C auf LB_{amp} selektioniert. Die Plasmide (*pCEP-Pu::LiAS*) positiver Klone wurden nach Prinzip der alkalischen Detergenzlyse mit handelsüblichen Plasmid-

Minipräp.- Kits isoliert und der Erfolg der Klonierung durch analytische Restriktion mit *NheI* (*BioZym*) und *BamHI* (*BioZym*) und Agarose Gelelektrophorese (1% (w/v) Agarosegele in TAE Puffer) überprüft. Klone mit erwarteten großen Fragmenten wurden zum Sequenzieren an die Firma GATC (Konstanz) geschickt und die erhaltenen Sequenzen mit den erwarteten *in silico* Produkten verglichen.

Für die rekombinante Proteinexpression in *BL21DE3* Bakterien wurde aus *Hydra magnipapillata* cDNA durch PCR mit den Primern 5' LiAS *NdeI* (aag**CATATG**ACAAGCACATACAC) und 3' LiAS *Bam*Stop (cat**GGATCC**TTAATTTT CTACGTCA) ein LiAS- Fragment erzeugt, das über TA-Überhänge (TA-Klonierung) in *pGEMT* (Promega) zwischen kloniert wurde. Gleichzeitig wurden durch die Primer die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* (in der Primersequenz jeweils fett hervorgehoben), sowie ein Stopp-Codon (3', kursiv) eingeführt, die später eine gerichtete Klonierung in den Zielvektor *pET-19b* (Novagen) ermöglichten (PCR Ansatz wie S. 19 oben Beschriebenen; PCR Bedingungen: 1x 95°C 3 min, 1x [95°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 1 min 20 s], 1x [95°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 1 min 20 s], 25x [95°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 1 min 20 s], 1x 72°C, 4 min).

Nach erfolgreicher Zwischenklonierung wurden die gewünschten Inserts mittels präparativer Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* ausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Zielvektor *pET-19b* kloniert (*pET-19b::LiAS*). Der Erfolg der Klonierung wurde durch Selektion auf LB_{amp}, analytisch Restriktion und Sequenzierung überprüft.

6.2. Rekombinante Proteinexpression in HEK 293, EBNA

Vor der Transfektion wurden 6-Well-Platten mit 80% konfluenten HEK 293, EBNA-Zellen durch einen Inkubationsschritt von 4 h in 1 ml Expressionsmedium synchronisiert und anschließend mit *Lipofect* (Gibco) transfiziert. Hierfür wurden 20 min vor Ende der Zellsynchronisierung eine Transfektionsmischung aus je 200 µl Transfektionslösung bestehend aus 1 µg Plasmid (*pCEP-Pu::LiAS*) und 10 µl *Lipofect* (Gibco) hergestellt und 20 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die Zelle gegeben und sanft geschwenkt. Bei erfolgreicher Transfektion wurde rekombinantes Protein von den Zellen ins Medium sekretiert. Nach 12 bis 18 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellüberstände abgenommen, auf Proteinexpression überprüft. Parallel wurde das Medium gegen Puromycin- haltiges Selektionsmedium (2 µg/ml) getauscht (jeweils ~1 ml/ well). Um mögliche Degradation der rekombinanten Proteine zu minimieren, wurden die gesammelten Zellüberstände mit PMSF oder EDTA-freiem Complete (Roche) versetzt und nach Möglichkeit auf Eis oder bei 4°C gearbeitet.

Stabil transfizierte Zellen (6-10 Wochen Wachstum in Puromycin-haltigem Medium) wurden in Zellkulturflaschen vermehrt und Proteinüberstände in 4-6 Passagen gesammelt. Parallel wurden Aliquots stabiler Klone in 5% DMSO in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.3. Rekombinante Proteinexpression in BL21DE3

Chemokompetente *BL21DE3* wurden nach Hitzeschockprotokoll mit *pET-19b::LiAS* transformiert. Anschließend wurden Vorkulturen mit je 100 µl transformierten Bakterien in 200 ml LB_{amp} angeimpft und ON bei 37°C, schüttelnd inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 2x700 ml und 5x500 ml LB_{amp} Medium mit jeweils 3 ml Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ~0,6 inkubiert.

Bei Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurden jeweils 5 ml Kultur als negativ Kontrolle (K-) entnommen, pelletiert und in PBS resuspendiert, wobei das jeweilige Volumen PBS wurde entsprechend der Formel $[(OD_{600} * 100) / 4] * 5 = x \mu\text{l PBS}$ errechnet wurde. Schließlich wurden die negativ Kontrollen mit 4x Lämmli- Puffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Parallel wurde die Proteinexpression in den restlichen Bakterien mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Nach 2 h wurden erneut jeweils 5 ml Kultur entnommen, pelletiert und in x µl PBS (entsprechend oben genannter Formel) resuspendiert. Die als „gesamt Protein“ (GP) bezeichneten Proben wurden ebenfalls in

4x Lämmli Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert. Anschließend wurde die restliche Bakteriensuspension pelletiert (10 min, 1000 xg, 4°C, Ausschwingrotor), der Überstand verworfen und die Pellets entweder bei - 20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert oder aufgeschlossen.

Zum Aufschluss der Bakterien wurden die Pellets mit x µl PBS (entsprechend Formel) aufgenommen und auf Eis sonifiziert bzw. in einem entsprechenden Volumen 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl) resuspendiert. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde die Suspension bei 4°C 30 min mit 18000 xg zentrifugiert (Sorvall, S34) und Überstände (Ü) von Pellets (P) getrennt. Die Pellets wurden anschließend in einem Volumen PBS aufgenommen, das dem Volumen des abgenommenen Überstandes entsprach. Von beiden Fraktionen wurden jeweils 50 µl Aliquots entnommen und entsprechend in 4xLämmli-Puffer aufgenommen.

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden alle entnommen Proben (negativ Kontrolle K-[vor Induktion], gesamt Protein GP, Überstand nach Aufschluss Ü [lösliches Protein] und Pellet nach Aufschluss P [unlösliches Protein]) 5 min bei 95°C denaturiert und jeweils 10 µl der verschiedenen Proben durch SDS-PAGE auf 12% Acrylamidgelen analysiert. Von drei identisch beladenen Gelen wurde nach SDS-PAGE ein Gel *Rapid Coomassie* gefärbt und die restlichen zwei Semi-Dry (15V, 15 min) auf Methanol aktivierte und mit Transferpuffer äquilibrierte PVDF (Hybond P; Amersham) Membranen übertragen.

Nach dem Proteintransfer wurden die verbleibenden Acylamidgele ebenfalls *Rapid Coomassie* gefärbt und die Membranen 1 h mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS mit 0,1% (v/v) Tween (PBT) blockiert. Es folgte eine Inkubation ON bei 4°C mit anti-penta-His- oder anti-LiAS-Antikörpern, jeweils 1: 1000 in 5% Milchpulver/PBT verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x 10 min mit PBT gewaschen und 1 h bei RT mit Ziege anti-Kaninchen Meeretichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach 3x 10 min PBT Waschschritten erfolgte 1 min Inkubation in ECL-Lösung mit anschließender Detektion und Filmentwicklung.

6.4. Reinigung des rekombinanten Proteins und Antikörperproduktion

6.4.1. Reinigung von rekombinanten Protein aus HEK 293, EBNA Zellen und Antikörperproduktion

Alle beschriebenen Schritte zur Isolierung rekombinanten Proteins fanden bei 4°C statt. Zunächst wurde eine 20 ml Säule mit 5 ml Nickel- NTA-Agarose durch 1 g Sedimentation gepackt und bei 4°C nacheinander mit 20 ml H₂O, und 20 ml PBS gespült. Anschließend wurden in mehreren Durchgängen die Proteinüberstände von 6 Passagen (3 l) auf die Säule gegeben und die Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen PBS (100 ml) gespült. Das rekombinante Protein wurde anschließend mit 250 mM Imidazol fraktioniert à 1 ml eluiert und die erhaltenen Fraktionen entweder bei -20°C eingefroren oder bei 4°C gelagert und im Western- Blot Experimenten überprüft. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereint und über Vivaspin-Proteinkonzentratoren (Satorius) in PBS umgepuffert und aufkonzentriert.

Zur Herstellung eines polyklonalen Kaninchen Antikörpers wurden ca. 500 µg rekombinantes HyLiAS an die Firma Eurogentec (Belgien) geschickt. Nach Firmen internen Standardprotokoll erfolgten 4 Immunisierungen mit jeweils 100 µg Protein (vgl. Tab. M2), die je 2-3 ml „small bleed“ (SB, Tag 38), ca. 20 ml „large bleed“ (LB, Tag 66) und ca. 55 ml „final bleed“ (Tag 87) ergaben.

6.4.2. Reinigung von bakteriell exprimierten rekombinanten Protein

Alle Arbeitsschritte zur Isolierung von bakteriell exprimierten Protein erfolgten bei 4°C. Dazu wurde eine 20 ml Säule mit 2 ml Nickel NTA-Agarose durch 1 g Sedimentation gepackt und mit 20 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl) äquilibriert. Anschließend wurden aufgeschlossene Bakteriensuspension in 6 M GndHCl auf die Säule gegeben und nach Durchfluss mit dem 5-fachen Säulenvolumen (100 ml) PBS gespült. Rekombinantes Protein wurde abschließend fraktioniert mit 250 mM Imidazol à 1,5 ml eluiert. Die erhaltenen

Tag	0	14	28	38	56	66	87
Injektion	1.	2.	3.		4.		
Bleeding				ca. 2 ml		ca. 20 ml	ca. 50 ml

Tab. M2: Immunisierungs-Schema zur Antikörperherstellung

Die Tabelle entspricht dem Firmen internen Standard-Immunisierungsprotokoll der Firma Eurogentec zur Herstellung eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Serums. (Details siehe Text)

Fraktionen wurden bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren. Aliquots aller Fraktionen wurden mit anti-penta His Antikörper und anti-LiAS-Serum auf rekombinantes Protein überprüft. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei A_{280} gegen eine 250 mM Imidazolreferenz bestimmt.

6.5. Ammoniumsulfat-Fällung des Kaninchen Anti-Serums

Das polyklonale anti-LiAS-Serum wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung gereinigt und aufkonzentriert. Dazu wurden ein Volumen „large bleed“ (anti-LiAS-LB) mit einem Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung ON bei 4°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die Lösung 30 min bei 4°C mit 3000 xg zentrifugiert und der Überstand von Pellet getrennt. Anschließend wurden Pellets entweder bei -20°C eingefroren oder in sterilem PBS resuspendiert und in Aliquots à 50 und 20 µl bei -80°C gelagert.

6.6. Affinitätsreinigung des anti-HyLiAS-Antikörpers

Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Inkubationsschritte zur Affinitätsreinigung über Kopf drehend bei 4°C und alle Zentrifugations-schritte ebenfalls bei 4°C, mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 2000 (Ausschwingrotor), durchgeführt. Zur Vorbereitung der Affinitätsreinigung wurde das NHS- (N- hydroxysuccinimid) Sepharose Säulenmaterial (4FastFlow, Amersham) aktiviert. Dazu wurde abhängig vom Volumen der Proteinprobe, das doppelte Volumen Säulenmaterial (hier: 4 ml) verwendet und diese mit dem 10-fachem Volumen kalter, 1 mM HCl (hier: 40 ml) 5 min inkubiert.

Nach Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Lösung gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl; pH 7) getauscht und 5 min äquilibriert. Anschließend wurde die NHS-Sepharose erneut durch 5 min Zentrifugation pelletiert und der Überstand bis auf 1 Volumenteil, welches dem doppelten Volumen der später eingesetzten Proteinprobe entsprach (hier: 4 ml), verworfen. Parallel wurde 1,26 mg bakteriell exprimiertes, rekombinantes LiAS Protein über Vivaspin- Proteinkonzentratoren (Sartorius) in 2 ml Kopplungspuffer umgepuffert und anschließend mit aktivierter NHS-Sepharose (4 ml in Kopplungspuffer) in einem Volumen-Verhältnis von 2:1 ON inkubiert (2 ml Protein in Kopplungspuffer mit 4 ml NHS-Sepharose). Nach 3 Waschschritten für 5 min mit dem 3-fachem Sepharosevolumen (hier 12 ml) und jeweils 5 min Zentrifugation bei 4°C, wurde die Suspension 3 h in Blockierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7) inkubiert. Danach folgten erneut je 3 Waschschrritte à 5 min mit Waschpuffer 1 (0,1 M NaCO₃, 0,5 M NaCl, pH 7) und Waschpuffer 2 (0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 3,5).

Nach 5 min Äquilibration mit dem 3 fachem Sepharosevolumen TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7) wurde der Überstand verworfen und es erfolgte die Antikörperkopplung. Das zu reinigende Serum (5 ml anti-LiAS-LB; Ammoniumsulfat gefällt) wurde 1:1 mit TBS-Puffer gemischt und 2 h bei 4°C mit NHS-Sepharose-gekoppelten Protein inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min wurde der Überstand gesammelt und zur weiteren Verwendung auf 4°C gelagert. Das Pellet wurde in 4 ml TBS resuspendiert und in einer 10 ml Säule durch 1 g Sedimentation gepackt.

Anschließend folgten Waschschrritte mit dem jeweils 5-fachem Bettvolumen in TBS, stringentem Waschpuffer (500 mM NaCl, 0,2% Triton X100, 20 mM Tris-HCl; pH 7)

und TBS. Abschließend wurde der affinitätsgereinigte anti-LIAS-Antikörper mit dem 5-fachen Bettvolumen Elutionspuffer (150 mM NaCl; 200 mM Glycin; pH 3) in vorbereitete Reaktionsgefäße mit je 100 µl Neutralisationspuffer (2 M Tris-HCl; pH 8,5) in 10 Fraktionen à 1 ml eluiert. Zur Kontrolle wurden je 2 µl der affinitätsgereinigten Antikörper Fraktionen im Dot-Blot-Verfahren auf Nitrocellulose Membranen mit Ziege anti-Kaninchen-Meeretichperoxidase (HRP) gekoppelten Antikörper getestet. Positive Fraktionen wurden für *whole mount* Antikörperfärbungen, Western- und Dot-Blot eingesetzt.

7. Immunologische Techniken

7.1. SDS-PAGE und Western Blotting

Soweit nicht anders beschrieben wurden für SDS-PAGE 4 % Acrylamid-Sammelgele und 10 % Acrylamid-Trenngele verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben wurden die Gele entweder sofort Coomassie gefärbt (s. S. 26, Abschnitt 7.2.) oder für Western Blots verwendet. Dazu wurden Proteine im „Semi-dry“-Verfahren (BioRad, 15 V; 10-15 min) auf Nitrocellulose- (Amersham) oder auf mit Methanol aktivierte und anschließend in Transferpuffer (siehe Anhang) äquilibrierte PVDF-Membranen (HybondP, Amersham) transferiert.

Anschließend wurde der Transfer durch Coomassie Färbung der entsprechenden Gele kontrolliert und Proteine auf den zugehörigen Membranen durch indirekte Immundetektion mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern detektiert. Je nach verwendeter Membran wurde hierfür zunächst 1 h mit 4 % Milchpulver (PVDF Membran) oder 30 min PBS mit 0,3% (v/v) Tween (Nitrocellulose Membran) bei RT blockiert. Die Inkubation in entsprechend verdünntem Erstantikörpern (Maus anti-penta-His: 1 zu 1000 verdünnt in PBS mit 0,1% (v/v) Tween (PBT); Kaninchen anti-LIAS: 1 zu 1000 verdünnt in PBT; Nickel konjugierte-Meeretichperoxidase (HRP): 1 zu 1000 in PBT) erfolgte entweder ON bei 4°C oder 1 h bei RT. Nach 3x10 min Waschschritten in PBT folgte die Zweitantikörperreaktion entsprechend den verwendeten Erstantikörpern (Peroxidase (PO) gekoppelter Ziege anti-Maus-Antikörper, 1: 1000 in PBT; HRP gekoppelter Ziege anti-Kaninchen-Antikörper, 1: 1000 in PBT) für 1 h bei RT. Nach 3 abschließenden Waschschritten für 10 min in PBT wurden die Membranen ca. 1 min bei RT in ECL-Lösung (siehe Anhang) inkubiert, in Photokassetten transferiert und Signale durch Film-Exposition und anschließende Entwicklung dokumentiert.

7.2. Coomassie Färbung

Polyacrylamid-SDS-Gele wurden zur Kontrolle des Proteintransfers nach Blotting oder zu Abschätzung der Proteinmenge direkt nach SDS-PAGE Coomassie gefärbt. Die Gele wurden hierfür 15-20 min in Fixierlösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) bei RT fixiert und anschließend mehrere Stunden oder ON mit Coomassie Färbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 0,006% (w/v) Coomassie G250) gefärbt. Im Anschluss wurden die Gele wiederholt in sterilem Wasser gewaschen, bis die Signale deutlich hervortraten. Coomassiegele wurden anschließend fotografisch dokumentiert.

7.3. Immunhistochemie: Einzel- und Mehrfachfärbungen

Für *whole mount* Antikörperfärbungen wurden alle Schritte auf Kippschüttlern durchgeführt. In Abhängigkeit vom verwendeten Erstantikörper (1. AK; vgl. Abb. M4, Tab. M3) wurden verschiedene Fixative, Fixierungszeiten und Bedingungen (RT, 4°C) getestet (Abb. M4), von denen die optimalen Bedingungen in Abb.M4 farblich hervorgehoben sind. Zweitantikörper (2. AK) wurde parallel zur Erstantikörperreaktion ON bei 4°C an entsprechend fixierten Tieren präadsorbiert. Hierfür wurde eine 2x Verdünnung in 10% Ngs (Alexa 568/488 Antikörper aus Ziege: 1:150, Alexa 488 Antikörper aus Esel 1:300) eingesetzt, die nach erfolgter Prä-Adsorption als 1x Verdünnung eingesetzt wurde.

Falls nicht anders beschrieben wurden ungefütterte Tiere (hauptsächlich *Hydra magnipapillata*) mit 2% Urethan in Hydramedium relaxiert und anschließend fixiert (vgl. Abb. M4). Danach wurden die Präparate 3x 10 min in PBS mit 0,1% (v/v) TritonX 100

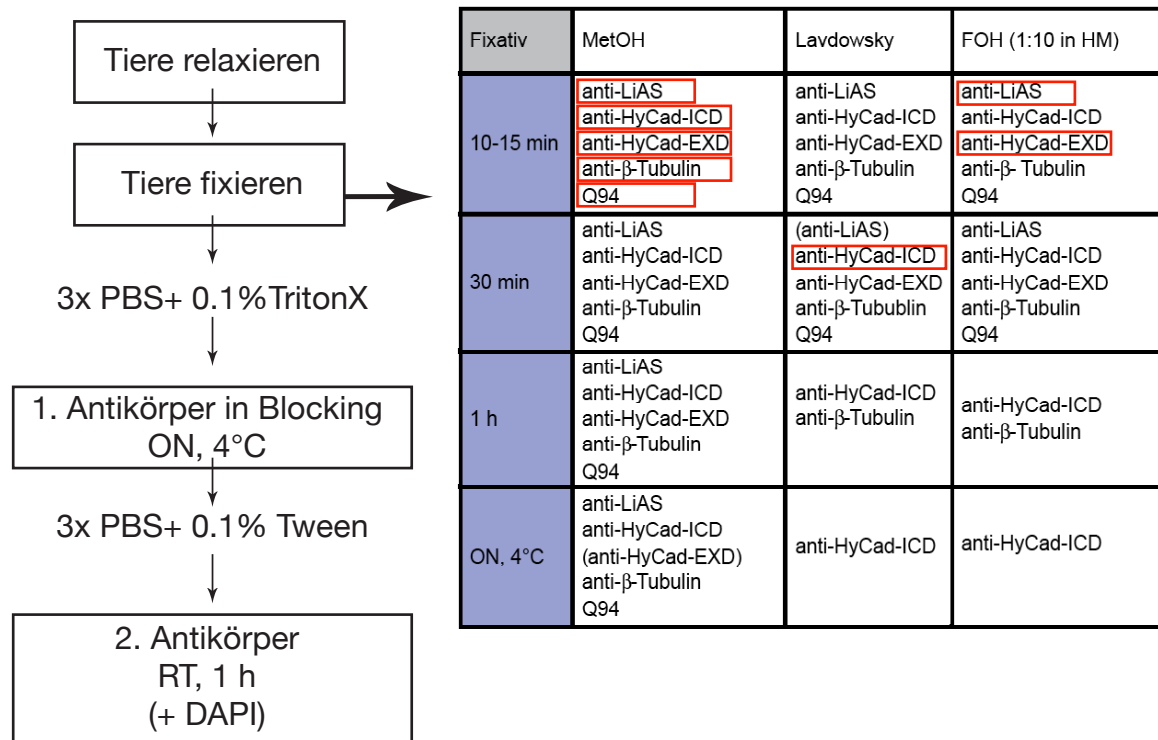


Abb. M4: Fließschema einer indirekten Immunfärbung

Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf einer indirekten Immunfärbung mit einem Primär-Antikörper (1. Antikörper). In der neben stehenden Tabelle wurden die Fixierungsbedingungen der verwendeten 1. Antikörper zusammengefasst und die optimalen Fixierungsbedingungen farbig hervorgehoben. (Details siehe Text)

(PBTri) inkubiert. Die Reaktion mit Erstantikörper erfolgte, falls nicht anders beschrieben ON bei 4°C. Hierfür wurden die verwendeten Antikörper in PBS mit 0,1% Tween (PBT) oder in PBT mit 5% (v/v) Ngs entsprechend verdünnt. Anschließend wurden die Proben 3x 10 min mit PBT gewaschen und die Signale ON bei 4°C mit präadsorbierten Alexa 488 bzw. Alexa 568 gekoppelten Zweitantikörper 1 h bei RT detektiert. Jeweils 15 min vor Inkubationsende wurde eine Kernfärbung mit DAPI (0,2-0,5 ng/μl Endkonzentration) durchgeführt. Ungebundener Zeitantikörper und überschüssiges DAPI wurden durch 3x 10 min Waschschrte in PBS entfernt. Abschließend wurden die Präparate in PBS/ Glycerin oder Glycerin/DAPCO eingebettet und fluoreszenz- bzw. confokal- mikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

Doppelfärbungen mit zwei 1. AK aus verschiedenen Spezies wurden parallel, analog zur beschriebenen Einzelfärbung durchgeführt (Abb. M4). Stammten beide 1. AK aus der gleichen Spezies, wurden die Färbungen seriell durchgeführt. Nach Abschluss der ersten Antikörperreaktion wie oben beschrieben wurden die Tiere 30 min bis 1 h Methanol reflexiert und ON bei 4°C oder 1 h bei RT in PBS mit 0,1% (v/v) Tween, 1% BSA (w/v) und 10% (v/v) Ngs blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Erstantikörper (1.AK#2) ebenfalls ON bei 4°C.

Nach Entfernen des zweiten Erstantikörpers (1.AK#2) und 3x 10 min Waschschrten mit PBT, wurde 40 min bis 1 h mit dem zweiten Sekundärantikörper (2.AK#2) bei RT inkubiert. Abschließend folgten 3x 10 min Waschschrte mit PBS und Einbetten in PBS/ Glycerin bzw. Glycerin DAPCO.

Antikörper	Spezies	Verdünnung
anti-LiAS	Kaninchen (polykl.)	1:1000 bis 1:15000
anti-HyCad-ICD	Kaninchen (Peptid)	1:1000
anti-HyCad-ExD	Kaninchen (polykl.)	1:100
anti- β -Tubulin	Maus (monokl.)	1:1000
Q94	Maus (monokl.)	1:100 bis 1:1000

Tab. M3: Verwendete Erstantikörper für *whole mount* Immunfärbungen

Details siehe Text.

7.4 Konkurrenz der Antikörperfärbung mit rekombinatem Protein

Für Konkurrenzexperimente mit rekombinantem LiAS-Protein (bakteriell exprimiert) und anti-LiAS-Serum wurden jeweils entsprechende anti-LiAS Verdünnungen mit Protein in einem Überschuss von 100x, 500x und 1000x bei 4°C ON inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper/Protein Lösung 10 min in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Mit dem oberen $\frac{3}{4}$ Volumen des Überstandes wurden anschließend eine Antikörperfärbung an Methanol fixierten Tieren (s.o.) durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Experiment ohne Protein und mit entsprechenden Überschüssen BSA, Milchpulver und wt- Knob Protein durchgeführt.

8. Biochemischer Interaktionsnachweis

8.1. Gelfiltration und Koelution

Zum biochemischen Nachweis der LiAS-Interaktion mit der intrazellulären Domäne von *Hydra*-Cadherin (HyCad-ICD) wurden beide Proteine rekombinant (LiAS-His; Cad-ICD-GST) in Bakterien exprimiert und die jeweiligen Proteine isoliert. Nach der Ermittlung des Elutionsprofils von LiAS-His auf einer Sephadex S75 Säule, wurden rekombinantes LiAS- und Cad-ICD-Protein in PBS (jeweils 25 μ M) 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend von einer PBS-äquilibrierten Sephadex S75 Säule fraktioniert eluiert. Rekombinantes Protein wurde indirekt, mit anti-penta His, bzw. anti-GST und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern, nachgewiesen.

8.2. Co-Immunpräzipitation von HyLiAS und HyCadherin (ICD)

Bakteriell exprimiertes HyCad(ICD)-GST (1 μ g) wurde an Gluthation Sepharose-Beats (20 μ l) gekoppelt (4 h überkopf-drehend, 4°C) und anschließend äquimolar mit bakteriell exprimierten HyLiAS-His inkubiert. Nach 3 Waschschritten in PBS mit 0,02% (v/v) Tween wurden Beats und Proteine mit 20 μ l Gluthation (10 mM) getrennt und die Proben zentrifugiert. Protein Überstände wurden mit SDS-PAGE (10% Polyacrylamidgelen) und Western Blot mit indirekter Immundetektion (anti-penta-His- und HRP-gekoppelten Sekundärantikörper) analysiert.

9. Inhibitorstudien mit DAPT

Die Inkubationsschritte für Inhibitorexperimente mit DAPT wurden in 6-well Kulturschalen unter *Hydra*-Standardkulturbedingungen und täglicher Fütterung durchgeführt. Dazu wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Werte je 30 Tiere in 3 ml DAPT-Medium (20 μ M DAPT in 1%DMSO in HM) kultiviert. Als Kontrollen wurden Tiere parallel in 1% DMSO in HM oder 100% HM gehalten. Im Abstand von 24 h wurden jeweils 5 Tiere Methanol-fixiert und mit

anti-LiAS/Alexa 488, bzw. anti-HyCad-ICD/Alexa 488 immunhistochemisch analysiert. Parallel wurden jeweils 5 Tiere nach Ende der DAPT-Inkubation in HM gewaschen und 1 d post Inhibitor fixiert und immunhistochemisch ausgewertet. Die ersten Ergebnisse dieses Versuches sind im Anhang dokumentiert.

10. Mikroskopie und Bildbearbeitung

Immunhistochemische Präparate wurden mit Epi-Fluoreszenz an Nikon Eclipse 80i ausgewertet und dokumentiert. Confokale Lasermikroskopie (CLSM)- und Spinning-Disk Lasermikroskopie-Aufnahmen wurden am Heidelberger Nikon Imagine Center, mit *Nikon C1Si spectral imaging confocal laser scanning*, bzw. mit *Perkin Elmer spinning disk confocal ERS 6 Line*-Systemen erstellt und mit dem Programmen *Image-J* und *Adobe Photoshop CS2* bearbeitet.